UNIVERSITE DE PARIS - FACULTE DE PHARMACIE

Année 1964-1965 Série E - N° 137

THESES

présentées

A LA FACULTE DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

par

Madeleine CHARPENTIER

1re thèse : ETUDE DE L'ACTIVITE CELLULOLYTIQUE DE SPOROCYTOPHAGA MYXOCOCCOIDES.

2e thèse : Propositions données par la Faculté :

Soutenues le : 3 avril 1965.

JURY : Mlle LAMBIN Président.

MM. COURTOIS (
GERMAN (Examinateurs.
POCHON (

EDITIONS A. G. E. M. P. - 8, RUE DANTE - PARIS (5e)

UNIVERSITE DE PARIS - FACULTE DE PHARMACIE

Année 1964-1965 Série E - N° 137

THESES

présentées

A LA FACULTE DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

par

Madeleine CHARPENTIER

1re thèse : ETUDE DE L'ACTIVITE CELLULOLYTIQUE DE SPOROCYTOPHAGA MYXOCOCCOIDES.

2e thèse : Propositions données par la Faculté :

Soutenues le : 3 avril 1965.

JURY : Mlle LAMBIN Président.

MM. COURTOIS (
GERMAN (Examinateurs.
POCHON (

EDITIONS A. G. E. M. P. - 8, RUE DANTE - PARIS (5e)

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544307_0037

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MM.	G. VALETTE. O ✻. C. O Ord. Nat. du Mérite	*Doyen*
	MM. JANOT. O ✻. C. O.....	*Assesseur*
	P. MALANGEAU. O. O.....	*Assesseur*
	L. RODINEAU. ✻ O. O.....	*Secrétaire Général*
Mme	S. FERRARI. O.....	*Attachée Principale*
	M. L. ESPINASSE. O. O.....	*Attachée*
M.	L. JEANDEL. O. O.....	*Attachée*
Mme	C. PEILLON.....	*Attachée*
M.	A. BRENN. ✻.....	*Attaché*
Mle	G. BIDEAU.....	*Secrétaire*
Mme	S. CERTAIN. O. O.....	*Secrétaire*
	M. COUSIN.....	*Secrétaire*
M.	A. DROUILLY. O. O.....	*Secrétaire*
Mme	L. WARNESSON. O.....	*Secrétaire*

DOYEN HONORAIRE

M.	R. FABRE. C ✻ C. O.....	*Membre de l'Institut*

PROFESSEURS HONORAIRES

MM.	M. DELEPINE. C. ✻. C. O	*Membre de l'Institut*
	I. LAUNOY. O. ✻. O. O	
	P. FLEURY. O. ✻. C. O	
	M. PICON. O. ✻. O. O	
	C. BEDEL. ✻. O. O.....	
	R. FABRE. C. ✻. C. O	*Membre de l'Institut*

PROFESSEURS

M. M. JANOT. O.✻.C.Q	*Pharmacie galénique (T)*
G. VALETTE. C.✻.C.Q Ord. Nat. du Mérite	*Pharmacodynamie (T)*
R. PARIS. ✻.C.Q	*Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale (T)*
M. GUILLOT. ✻.O.Q	*Physique (T)*
J.A. GAUTIER. ✻.O.Q	*Chimie organique (T)*
S. LAMBIN. ✻.O.Q	*Microbiologie (T)*
Y. RAOUL. ✻.O.Q	*Physiologie (T)*
J. COURTOIS. ✻.O.Q	*Chimie biologique (T)*
L. DOMANGE. ✻.C.Q	*Chimie minérale (T)*
P. CRETE. ✻.O.Q	*Botanique (T)*
R. TRUHAUT. O.✻.O.Q	*Toxicologie et Hygiène industrielle (T)*
A. MORETTE. ✻.O.Q	*Hydrologie (T)*
R. CAVIER. O.Q	*Parasitologie (T)*
A. QUEVAUVILLER. ✻.O.Q	*Hygiène et Education Sanitaire (T)*
R. MOREAU. ✻.O.Q	*Pharmacie chimique (T)*
A. GERMAN. O.Q	*Virologie et Sérologie (T)*
M. PIETTE. ✻.O.Q	*Biologie sanguine (T)*
P. MALANGEAU. O.Q	*Chimie analytique (T)*
M. GIRARD. O.Q	*Chimie appliquée à l'expertise (T)*
G. DILLEMANN.....	*Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)*
G. DEYSSON. O.Q	*Cytologie végétale (T)*
J. FLAHAUT. Q.....	*Minéralogie (T)*
C. BOUDENE.....	*Toxicologie et Hygiène industrielle (T)*
J. RENAULT. Q.....	*Chimie organique (T)*
A. LE HIR.....	*Pharmacie galénique*
P. LARUELLE.....	*Physique*
P. ROSSIGNOL.....	*Pharmacodynamie*
A. MANGEOT. O.Q	*Pharmacie galénique industrielle*
P. DELAVEAU.....	*Matière médicale*
Y. COHEN.....	*Sciences naturelles*
H. RENAULT.....	*Physique*

MAITRES DE CONFERENCES

MM.	R. BOURBON.....	*Chimie analytique*
	G. LE MOAN.....	*Sciences appliquées*
	C. PAOLETTI.....	*Sciences appliquées*
	P. REYNAUD.....	*Sciences physico-Chimiques*
	J. POISSON.....	*Sciences naturelles*
	A. DESVIGNES. ☾.....	*Cryptogamie et technique bactériologique*
	F. PERCHERON.....	*Sciences appliquées*
	J. SAVEL.....	*Biologie animale*
	J. BORY. ☾.....	*Sciences naturelles*
	M. MIOCQUE.....	*Chimie organique*
	J. L. GUIGNARD.....	*Botanique générale*
	J. C. GOUNELLE.....	*Sciences naturelles*
	P. BINET.....	*Biologie animale et Zoologie*
	C. COMBET-FARNOUX.....	*Chimie organique*
Mme	M. PLAT.....	*Sciences appliquées*
MM.	E. DELACOUX.....	*Sciences physico-Chimiques*
	J. DIDRY (F.F.).....	*Mathématiques appliquées aux Sciences expérimentales*

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

Mme	J. BLANC (F.F.).....	*Chimie analyses (1re A. N)*
MM.	A. CARLIER (F.F.).....	*C.E.S. Pharmacie galénique Industrielle*
	J. CHARLES (F.F.).....	*Mathématiques*
	C. DAGRON (F.F.).....	*Chimie préparation (1re A. N)*
Mle	M. T. DECAUDIN (F.F.).....	*Biologie animale (3e A.).*
M.	C. DREUX (F.F.).....	*C.E.S. Electrochimie appliquée à l'analyse*
Mle	G. DUMANT (F.F.).....	*Chimie préparations (1re A. N)*
MM.	P. GEORGES (F.F.).....	*C.E.S. Parasitologie*
	P. GESTEAU. ☼ . ○ . ☾.....	*C.E.S. Biochimie*
Mle	M. J. GOURSAT (F.F.).....	*Chaire de botanique*
MM.	H. GUERIN. ☼ . ○ . ☾.....	*Biologie végétale (3e A)*
	M. GUERNET.....	*Chimie (2e et 3e années)*
	M. HAMON. (F.F.).....	*Chimie analyses (1re A. N)*
	J. HARISPE. ○ . ☾.....	*Chimie préparations (1re A)*
	G. HAZEBROUCQ (F.F.).....	*Physique*

M.	J. HENRY.....	*Chimie (4e Année)*
Mme	J. HUBERT.....	*C.E.S. Bactériologie*
Mme	M. J. HURON (F.F.).....	*Mathématiques*
Mle	Y. JUND.....	*C.E.S. Microbiologie*
M.	M. LEBOEUF (F.F.).....	*C.E.S. Pharmacotechnie*
Mme	N. LEGER (F.F.).....	*Zoologie*
M.	R. LELUC.....	*Microbiologie (4e A)*
M.	A. LEMONNIER.....	*Chimie analyses (2e et 3e A)*
Mme	S. LEMONTEY.....	*Chimie (4e A).*
Mle	M. LONGEVIALLE (F.F.).....	*Chaire de botanique*
Mle	S. LONGUEVALLE.....	*Chimie examens*
MM.	J. MANDEREAU (F.F).....	*C.E.S. Pharmacotechnie*
	H. MARTIN FRERE (F.F.).....	*Chimie préparations (1re A)*
Mle	H. MORIN.....	*C.E.S. Pharmacodynamie*
M.	H. MOSKOWITCH, (F.F.).....	*Chimie analyses (1re A N.)*
Mme	M. J. NOTTEGHEN (F.F.).....	*Zoologie*
MM.	NGUYEN PHU LICH.....	*C.E.S. Toxicologie*
	M. PARIS (F.F.).....	*C.E.S. Analyse appliquée au contrôle des médicaments (Biologie)*
	R. PERLES.....	*C.E.S. Biochimie*
	J. PESTIS (F.F.).....	*Biologie animale (2e A)*
	P. POULLAIN.....	*C.E.S. Hématologie*
	J. RIVET (F.F.).....	*Chaire de Physique*
Mme	M. ROBERT.....	*C.E.S. Sérologie*
Mle	A. ROLLEN.....	*Biologie végétale (2e A)*
Mle	L. SEGUIN..... (F.F.)	*C.E.S. Analyse appliquée au contrôle des médicaments (physico-chimie)*
Mme	M. SEILLER (F.F.).....	*Pharmacie galénique industrielle*
M.	J. YONGER (F.F.).....	*Chimie analyses (1re A)*

BIBLIOTHEQUE

Mle	Y. RUYSSEN.....	*Conservateur, chargée de la direction*
Mle	S. LAVAUD.....	*Conservateur*
Mme	G. KREHMER.....	*Conservateur*
Mme	A. DESGRIPPES.....	*Bibliothécaire*

A mes Parents,

A mon Mari,

A tous les Miens,

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

En témoignage de mon affection.

A Monsieur le Professeur POCHON

Chef du Service de Microbiologie du Sol
à l'Institut Pasteur.

A qui nous devons le sujet de notre travail, nous exprimons sincèrement notre profonde gratitude de nous avoir apporté dans notre recherche l'appui bénéfique et sans cesse renouvelé de ses conseils éclairés et de sa compréhension toute bienveillante.

A Mademoiselle le Professeur LAMBIN

Professeur de Microbiologie à la
Faculté de Pharmacie,

Nous exprimons notre profonde gratitude de nous avoir orientée, conseillée, soutenue dans cette entreprise, et nos très sincères remerciements d'accepter la présidence de notre jury.

A Monsieur le Professeur COURTOIS

Professeur de Chimie Biologique
à la Faculté de Pharmacie,

A Monsieur le Professeur GERMAN

Professeur de Virologie et Sérologie
à la Faculté de Pharmacie,

Nous adressons notre respectueuse reconnaissance de nous faire l'honneur de préter attention à notre ouvrage et d'accepter de le juger.

A la Direction de l'Institut PASTEUR,

aux Collaborateurs du Service de Microbiologie du Sol,

Nous transmettons nos remerciements reconnaissants de nous avoir accueillie dans leur Service et permis d'effectuer nos recherches.

TABLE DES MATIERES

Page

INTRODUCTION 1

PREMIERE PARTIE : ACTIVITE DE DEGRADATION 5

A - THEORIES GENERALES DE LA CELLULOLYSE 7

1 - La CELLULOSE 8

a - Structure morphologique de la cellulose 8
b - Structure atomique de la cellulose 10
c - Modifications de la cellulose au cours de l'hydrolyse 11
d - Celluloses solubilisées 12

2 - MECANISME ENZYMATIQUE DE LA DEGRADATION DE LA CELLULOSE 13

- Hypothèses de PRINGSHEIM, REESE, STONE, PETTERSON; relations entre enzyme et substrat.. 13
- Conclusions 18

B - ETUDE SOMMAIRE DU SPOROCYTOPHAGA 20

1 - Morphologie, forme végétative, microcystemobilité. 21

2 - Nutrition azotée et carbonée 22

3 - Formation du mucopolyoside : produit de synthèse.. 23

C - TECHNIQUES UTILISEES 25

1 - La souche 25

2 - Milieu de Culture 27

3 - Préparation des produits à étudier 28

4 - Tests d'activité enzymatique 29

a - Principe 29
b - Milieux de réaction 29
c - Déterminations quantitatives 30
. pouvoir réducteur : méthode de SUMMER..... 31
. Glucose : méthode enzymatique : Glucose-Oxyd.. 31
d - Détermination qualitative : chromatographie.... 32
. Solvants 32
. Révélateurs 32

D - RESULTATS 34

I - DETERMINATIONS QUANTITATIVES DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE . 34

A - SUBSTRAT INSOLUBLE, Variations en fonction : 34

1 - du pH 34
2 - du pH et de la température 35
3 - de la température et du temps 35
4 - de la concentration du substrat 36

B - SUBSTRAT SOLUBLE, Variations en fonction : 36

1 - de la nature du substrat Blanose 36
a - degré de polymérisation 37
b - degré de substitution 37
2 - du pH 38
3 - du pH et de la température 38
4 - de la durée de la réaction 39
5 - de la concentration du substrat 39

CONCLUSIONS 39

II - DETERMINATIONS QUALITATIVES DES PRODUITS DE DEGRADATION. 41

A - ETUDE QUALITATIVE DES PRODUITS OBTENUS A PARTIR D'UNE PREPARATION ENZYMATIQUE BRUTE AGISSANT SUR DES SUBSTRATS INSOLUBLES OU NON 41

B - ETUDE QUALITATIVE DES PRODUITS OBTENUS A PARTIR DE FRACTIONS ENZYMATIQUES AGISSANT SUR LES MEMES SUBSTRATS..... 45

1 - Fraction E1 46
2 - Fraction CELLOBIASE 46
3 - Fraction CELLULASE 49
a - activité sur cellulose soluble ou non 49
b - étude du mécanisme de dégradation en fonction du temps 49

C - CONCLUSIONS : 50

1 - Présence de glucose et d'oligosides d'origine différente 50
2 - Hypothèses émises sur le mécanisme de dégradation : solubilisation, réceptivité et spécificité de l'enzyme 51

CONCLUSIONS DE LA PREMIERE PARTIE : 56

1 - Résultats de l'étude quantitative 56

2 - Résultats de l'étude qualitative : 56

a - Recherche des Oligosides 56
b - Mécanisme de dégradation 57

DEUXIEME PARTIE : ACTIVITE DE SYNTHESE 59

INTRODUCTION 61

I - ACIDES URONIQUES ET DERIVES PHOSPHORYLES 63

A - Mise en évidence de l'activité de synthèse 63

1 - Dégradation par voie Oxydative et théorie de WINOGRADSKY 63
2 - Dégradation par voie d'Hydrolyse et Synthèse par voix Oxydative 64

B - Expérimentation : 65

1 - Techniques 65
a - Caractérisations chimiques : acides uroniques dérivés phosphorylés, acides nucléiques 65
b - Chromatographie : solvants, révélateurs 68

2 - Résultats : 69
a - Acides uroniques 70
b - Dérivés phosphorylés 71
c - Acides nucléiques 71
d - Oligosides 72

3 - Conclusions 72

II - REACTIONS DE TRANSOSYLATION 75

Introduction : Mécanismes des réactions de transfert, activité transférante des microorganismes celluloly-tiques, spécificité de l'action transférante 75

A - Techniques utilisées 79

1 - Protocole opératoire des réactions de transfert.. 79
2 - Chromatographie 80
3 - Electrophorèse 80
4 - Identification après élution 80

B - Résultats : CELLOBIOSE DONATEUR ET ACCEPTEUR..... 80

a - Réactions de transfert sur cellobiose à 5 %..... 81

1 - en pH 5 81
2 - en fonction du temps 82
3 - identification d'un oligoside 83
4 - rendement de la réaction 83

b - Réactions de transfert sur Cellobiose à 2 °/oo ... 84

1 - en fonction du temps 84
2 - en fonction du pH 85

Conclusions 85

C - Résultats : Glucose accepteur 87

1 - Techniques 88
2 - Résultats 88
3 - Recherche du Donateur 89

CONCLUSIONS GENERALES 93

A - ACTIVITE DE DEGRADATION 94

1 - Etude quantitative 94
2 - Etude qualitative 94
a - Oligosides 94
b - Mecanismes de dégradation 95

B - ACTIVITE DE SYNTHESE 95

1 - Phénomènes d'Oxydation : acides uroniques et dérivés phosphorylés 95
2 - Phénomènes de transosylation : sur Cellobiose et sur Glucose 96

BIBLIOGRAPHIE

oOo

INTRODUCTION

La microflore cellulolytique du sol, Bactéries aérobies et anaérobies, Champignons, Actinomycètes et Myxobactéries, assure la dégradation de la cellulose végétale qui constitue la majeure partie des réserves carbonées régulièrement renouvelées à la surface de la terre. Cette cellulose insoluble, inassimilable par les plantes et par la majorité des microorganismes du sol, doit être décomposée en ses éléments constitutifs les plus simples : glucose et cellobiose, ceux-ci pouvant être directement assimilés, ou être l'objet de nouvelles synthèses. Seuls les microorganismes cellulolytiques sont capables de réaliser cette dégradation de la cellulose insoluble.

L'activité de dégradation, ou activité cellulolytique, due à la présence d'enzymes capables d'hydrolyser la molécule homogène et polymérisée de la cellulose a été l'objet de nombreuses recherches. Ce sont d'abord les bactéries anaérobies qui ont retenu l'attention des premiers chercheurs : travaux de POPOFF (96) et d'OMELIANSKY (89), sur les bactéries anaérobies des marécages, travaux de SIMOLA (113-114), et plus récemment les travaux de POCHON (94-95) sur les bactéries cellulolytiques de la panse des ruminants.

Cependant, les bactéries aérobies, sporulées ou non, en particulier les ***Vibrio*** et les ***Cytophaga***, sont répandus dans tous les sols de nos régions tempérées, à pH voisin de la neutralité, à humidité assez régulière, bien aérés, et leur action cellulolytique a été reconnue depuis les travaux de Van ITERSON (52).

Parmi ces espèces bactériennes aérobies, la famille des Cytophagaceae a retenu l'attention des chercheurs pour plusieurs raisons. Ces germes, présents dans presque tous les sols, peuvent décomposer rapidement et complètement la cellulose, et ce métabolisme s'accompagne de la formation d'un abondant mucus. Mais

par leur morphologie, et leur classification parmi les espèces bactériennes, les *Cytophaga* et les *Sporocytophaga* (pour la facilité de l'exposé, nous utiliserons indifféremment le terme de *Cytophaga* et de *Sporocytophaga*, les différences morphologiques entre ces deux genres seront exposées ultérieurement) ont posé beaucoup de difficultés à ces mêmes chercheurs ; aussi l'activité cellulolytique et l'étude des mécanismes enzymatiques a-t-elle été assez négligée. Nous pouvons dire que les travaux de HUTCHINSON et CLAYTON (49), puis ceux de WINOGRADSKY (134-135) de KRZEMIENIEWSKA (63), IMSENECKI et SOLNTZEVA (50-51), de STANIER (119), de FAHRAEUS (29) et de HARMSEN (41) ont été surtout consacrés à l'étude de la morphologie, de la physiologie et de la reproduction de ces germes, et ce n'est qu'en 1944 que FAHRAEUS (29) a abordé leur étude enzymatique.

Il est intéressant de souligner que HUTCHINSON et CLAYTON (49) puis WINOGRADSKY (134) considéraient ces germes comme des cellulolytiques stricts, ne pouvant métaboliser ni le glucose, ni le cellobiose, et que ce métabolisme a seulement été reconnu par STANIER (119) et par FAHRAEUS (29-30). Aussi, WINOGRADSKY (134-135) pensait que le mucus qui apparait rapidement lors d'une culture sur cellulose était une forme intermédiaire de la dégradation de la cellulose, et il lui donnait le nom d'"Oxycellulose", en raison de son caractère acide. Il expliquait donc la dégradation de la cellulose par un mécanisme oxydatif, d'autant plus qu'il n'avait jamais décelé de sucres réducteurs dans les produits de dégradation, et que les *Cytophaga* ne pouvaient métaboliser de sucres simples.

Mais FAHRAEUS (29) démontra que les *Cytophaga* cultivés sur glucose produisaient de la même façon du mucus, et que ce mucus ne pouvait donc plus être considéré comme un produit de la dégradation de la cellulose, mais comme un produit de synthèse bactérienne. Aussi, chercha-t-elle à mettre en évidence un mécanisme de dégradation par voie d'hydrolyse, et ses premiers essais lui permirent de reconnaitre le glucose comme produit de dégradation de la lichénine et de la cellophane ; mais, jamais elle ne décela ce même glucose dans les cultures faites sur cellulose.

Ainsi,le problème de l'activité cellulolytique des *Cytophaga* et des *Sporocytophaga* nous est apparu sous un double aspect : celui d'une activité de dégradation hydrolytique, et celui d'une activité de synthèse à partir des éléments issus de l'hydrolyse et permettant l'élaboration de ce mucus caractéristique.

Nous avons étudié dans la première partie de ce travail quantitativement et qualitativement la dégradation de la cellulose insoluble et de la cellulose solubilisée partiellement par voie chimique. Les déterminations quantitatives nous ont permis de préciser les conditions optimales de l'activité des enzymes responsables de

cette hydrolyse : pH, température, concentration, durée de réaction.

Par l'étude qualitative , des produits résultant de l'hydrolyse de la cellulose, par une préparation enzymatique brute et par des préparations fractionnées, nous avons décelé la présence du glucose dans tous les cas, et celle d'Oligosides formés de deux, trois, quatre molécules de glucose, liées entre elles par la liaison 1-4, comme dans la molécule de cellulose, mais aussi la présence d'autres oligosides ne possédant pas cette liaison 1-4, et d'esters phosphorylés.

Ceci nous a amené à étudier dans une seconde partie les mécanismes de synthèse qui peuvent expliquer la formation du mucopolyoside caractéristique, en examinant :

- d'une part, les réactions de transglucosylation effectuées sur le cellobiose et sur le glucose par ces mêmes enzymes qui libèrent le glucose de la molécule homogène de la cellulose , et qui permettent la synthèse d'oligosides.

- d'autre part, les produits d'oxydation : acides uroniques et dérivés phosphorylés, en précisant leur origine synthétique et leur place dans les mécanismes d'oxydation.

Ces premières investigations sur l'activité enzymatique des *Sporocytophaga* nous ont permis de démontrer leur activité d'hydrolyse et de synthèse, synthèses effectuées à partir des produits de l'hydrolyse et auxquelles participent plusieurs mécanismes.

oOo

PREMIERE PARTIE

ACTIVITE DE DEGRADATION

oOo

- a -

-b-

Coupes transversales de fibres de coton .
a-coton naturel,non traité .
b-coton acètylé (44%) . Grossissement =500.

d'après ROLLINS.M.L. & TRIPP.V.W. Methods in Carbohydrate Chemistry.III. Cellulose.p.342.

ETUDE DU MECANISME DE DEGRADATION DE LA CELLULOSE PAR VOIE ENZYMATIQUE

A - THEORIES GENERALES DE LA CELLULOLYSE

Si l'on groupe sous le même terme de "microorganismes cellulolytiques" des microorganismes tels que des bactéries aérobies et anaérobies, des myxobactéries, des actinomycètes, et des champignons, c'est en raison de leurs caractères enzymatiques qui leurs permettent de dégrader un substrat aussi insoluble que la cellulose, et d'un poids moléculaire aussi élevé.

Ce substrat représente la majeure partie de la matière carbonée organique répandue dans la nature, et sa transformation en éléments simples reste sous la dépendance étroite de ces microorganismes au premier rang desquels, nous devons mentionner les bactéries aérobies : ***Sporocytophaga*** et ***Cytophaga***.

Mais il faut souligner que ce mécanisme d'hydrolyse a été l'objet d'études beaucoup plus nombreuses sur les champignons (PRINGSHEIM (97), GRASSMANN (39), REESE & LEVINSON (98), WHITAKER (131)) que sur les bactéries : WINOGRADSKY (134), STANIER (118), FAHRAEUS (29), Mac BEE (71), HULCHER et KING (47) et la majorité des travaux des plus anciens (PRINGSHEIM (97) aux plus récents (PETTERSON et PORATH (92) ont été réalisés à partir de ces microorganismes dont la purification est plus aisée, et la croissance plus rapide.

Grace à l'obtention de celluloses solubles, et aux techniques de fractionnement sur colonnes, d'électrophorèse et de caractérisations spécifiques, les différentes étapes de ce long mécanisme d'hydrolyse ont été plus largement connues.

Avant d'aborder leur étude nous devons considérer en premier lieu le substrat même de toutes ces réactions enzymatiques : la cellulose et les difficultés qu'elle impose en raison de sa structure physique et chimique.

1 - LA CELLULOSE

Le terme de "cellulose", dans son sens étymologique et botanique, désigne la paroi fibreuse des cellules végétales, formée de polysaccharides homogènes ou hétérogènes, polymérisés. Par extension ce terme appliqué à la cellulose purifiée du coton désigne un polysaccharide hautement polymérisé et constitué par des molécules de glucose liées entre elles par les atomes de carbone 1 et 4 (D. Glucopyranosyl β 1-4).

Il faut remarquer que la paroi de la cellule végétale jeune est uniquement constituée de cellulose pure, et rapidement les cellules âgées aux parois épaissies contiennent non seulement du glucose polymérisé, mais d'autres hexoses : mannose, galactose, des pentoses : xylose, arabinose, ces sucres existant sous forme de polymères : mannanes, galactanes, xylanes et arabanes. Ces polymères, avec les pectines et les hémicelluloses constituent l'ensemble des polysaccharides de la paroi végétale âgée, ou ce que l'on définit par le terme général de cellulose naturelle végétale . Il faut également mentionner les lignines, formées de longs polymères à structure phènolique, qui s'accumulent progressivement dans les cellules âgées.

La cellulose naturelle du coton est uniquement formée, même dans les cellules âgées, de molécules de glucose polymérisées, et possède donc une structure homogène. Elle se différencie de celle de la ramie ou du lin, également homogènes, par l'arrangement physique des micelles. La cellulose commerciale est préparée à partir du coton (coton cardé) traité par la soude diluée, puis blanchi par le chlorure de calcium, et lavé par l'acide chlorhydrique dilué, et l'eau. C'est à partir de cette cellulose du coton que l'on a pu déterminer la structure physique de cette grosse molécule que constitue la cellulose.

a - Structure morphologique de la cellulose .

De récentes études ont permis (ROLLINS et TRIPP (108)), par examen microscopique et microélectronique, d'établir plus précisément la structure de la fibre de cellulose naturelle : coton, ramie, jute et de la comparer à celle des fibres synthétiques obtenues par acétylation en particulier (rayonne).

- Des coupes faites au microtome (coupes de 7 μ d'épaisseur) ont montré que les fibres du coton naturel ont une section réniforme, avec au centre un canal linéaire ou "lumen" ; elles se distinguent de celles du lin ou de la ramie qui sont angulaires et à lumen punctiforme. Au contraire, les fibres synthétiques (acétate de cellulose)

sont beaucoup plus grosses, arrondies et ont un lumen très réduit ; on considère qu'une acétylation de 40 % double le diamètre de la fibre initiale (schéma ci-joint A).

- Ces fibres seraient formées : d'une paroi externe que les auteurs désignent sous le terme de "Primary Wall", d'une épaisseur de 0,1 µ et qui recouvre totalement la structure interne ou "secondary Wall", constituée elle-même par une superposition de microfibrilles de cellulose d'autant plus nombreuses que la cellule est plus âgée. Cette paroi secondaire d'une épaisseur de 4 µ laisse voir à son centre un lumen contenant encore des résidus protoplasmiques protéiques. Entre ces deux parois, une très mince enveloppe de 0,1 µ d'épaisseur a aspect spiralé protège l'ensemble des couches laminées de la seconde paroi (Winding) (schéma ci-joint B).

Ctte structure a pu être mise en évidence, soit par broyage aux ultra-sons suivi d'examen au microscope électronique, soit par microsolubilité. En effet la cellulose est une substance très peu soluble, (liqueur de SCHWEITZER ou solution d'éthylène diamine) et par action de ces complexes cuivriques on peut la solubiliser partiellement et donc observer les différentes couches de sa structure. Sous l'action du complexe cuivrique-éthylène diamine la structure interne de la fibre se gonfle, et déchire la paroi externe, qui ne reste fixée qu'en certains points ; ces points d'attache forment des espèces de petits bracelets entre lesquels la paroi interne apparait gonflée en petits ballons, avec sa structure laminée caractéristique. Cette paroi interne reste souvent enveloppée par la membrane de protection (Winding) torsadée et spiralée. Il faut d'ailleurs remarquer la différence de structure entre cette paroi intermédiaire spiralée transversalement et la paroi externe réticulée dont l'orientation est celle de l'axe de la fibre.

Par broyage de trente minutes, aux ultra-sons et après élimination de la paroi externe, on libère les microfibrilles de la paroi secondaire : ces microfibrilles de la fibre du coton sont en segments courts, très serrés les uns contre les autres, sous l'influence de forces internes (Van der WAALS) et contiennent des micelles cristallins caractéristiques. Au contraire dans la cellulose synthétique, les fibrilles sont beaucoup moins serrées et lorsque l'acétylation atteint 40 % une substance amorphe spongieuse se substitue à cette structure cristalline fibrillaire.

La structure interne des microfibrilles a été plus anciennement étudiée, et l'on a pu mettre en évidence les liaisons atomiques de ces différentes chaines qui constituent les microfibrilles (MEYER et OLISCH (78)).

b - Structure atomique de la molécule de cellulose .

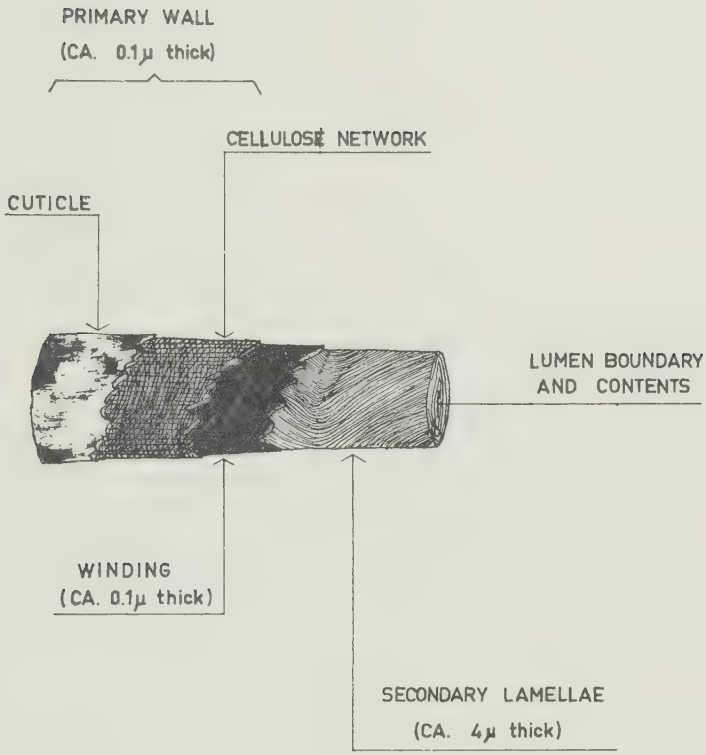
Les longues chaînes constitutives des microfibrilles, qui caractérisent cette molécule de cellulose sont donc uniformément constituées par des molécules de glucose, qui sont unies les unes aux autres par les atomes de carbone 1 et 4, formant ainsi une unité de structure à deux molécules de glucose, qui est le "cellobiose", dont la longueur est de 10,3 A° (figure ci-jointe). Dans ces chaînes tous les atomes de carbone sont liés par des valences principales (distance C-C= 1,54, distance C-O= 1,45 A°). A l'origine on peut envisager la présence de deux chaînes d'unités de cellobiose, chaînes d'orientation opposée, mais parallèles à l'axe de la fibre. La longueur de ces chaînes leur degré de polymérisation dépend de l'origine végétale de la cellulose. D'après STAUDINGER (120) la cellulose naturelle du coton a un degré de polymérisation de 3.500, lorsqu'elle est purifiée, il varierait entre 1.000 et 3.000 et la cellulose du bois aurait un degré de polymérisation de 600 à 1.000.

Ces chaînes se groupent parallèlement par cinquante environ pour former des microfibrilles. Mais l'arrangement de ces chaînes entre elles est particulièrement important, et l'étude des diagrammes de diffraction aux rayons X (MEYER et OLISCH (78)) a permis d'avancer le terme de maille cristalline monoclinique de dimensions déterminées : b (axe de la fibre) = 10,3 A° ; a= 8,35 A° c = 7,9 A° ; β = 84°.

La première dimension b = 10,3 A°, correspond à une unité de cellobiose ; dans la direction de l'axe des a, les chaînes de cellobiose sont associées à la chaînes b par des valences résiduelles se manifestant entre deux fonctions hydroxyles ; ces ramifications se répèteraient le long de la chaîne principale b avec une périodicité de 500 molécules de glucose, et le point de liaison de ces chaînes latérales sur les chaînes principales, serait un point vulnérable de la structure de la molécule . Cet arrangement cristallin ou micelle se trouve donc réparti régulièrement sur toute la longueur des chaînes de cellobiose , et ces zones cristallines délimitent donc des zones dites de "cellulose amorphe" ; cette substance amorphe peut contenir de l'eau ou d'autres substances.

Toutes ces chaînes, avec leur structure cristalline, sont réunies par groupes parallèles de cinquante, en microfibrilles d'environ 100 A° (HONEYMAN (45)). Les microfibrilles sont enroulées en spirales autour de l'axe de la fibre de coton en faisant un angle de 30°. Dans le cas de la ramie ou du lin, elles sont parallèles à l'axe.

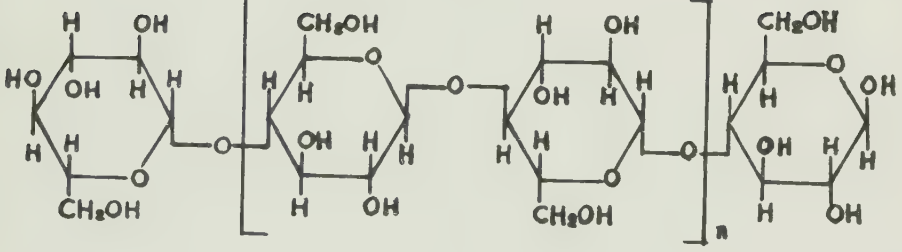
La disposition de ces microfibrilles dans les parois cellulaires laisse selon les espèces végétales des espaces lacunaires plus ou moins grands.



Représentation schèmatique de la structure d'une fibre de coton . (d'après ROLLINS.M.L. & TRIPP.V.W., Mehods in Carbohydrate Chemistry. III. Cellulose . p. 358.)

Fig. B.

CELLOBIOSE


H
OH
HO
OH
H
H
H
H
O
CH₂OH
O
CH₂OH
H
H
O
OH
H
H
H
OH
O
H
H
OH
H
H
O
CH₂OH
n
CH₂OH
O
OH
H
H
OH
H
H
OH

On comprend donc que la cellulose végétale dans laquelle les microfibrilles sont très serrées, ou les espaces lacunaires très étroits, (20 A° dans le coton, 40 à 60 A° dans la cellulose régénérée (COOKE 18), et où la proportion de substance cristalline est élevée par rapport à celle de la substance amorphe (70 % dans le coton) sera une cellulose difficilement atteinte par l'eau et par les molécules d'enzyme. Son hydrolyse ne pourra se faire que lentement et exigera un contact intime entre le substrat insoluble et l'enzyme responsable, avec rupture préalable de l'enveloppe qui protège les microfibrilles.

c - Modifications de la structure de la cellulose au cours de l'hydrolyse

Comment des microorganismes, champignons, ou bactéries peuvent-ils attaquer un substrat aussi insoluble que la cellulose ? Cette question, maintes et maintes fois posée, ne connait encore pas une réponse complète. L'observation très fine des différentes étapes qui correspondent à la transformation d'un produit insoluble en un produit assimilable permet d'espérer cette réponse .

On a montré que la première transformation de cette structure serait la rupture de l'enveloppe externe qui, lorsqu'elle est inaltérée, s'oppose à la pénétration de l'eau. Des filtrats de culture de champignons cellulolytiques peuvent provoquer cette déchirure de la paroi externe en moins de trente minutes, comme l'ont montré REESE et GILLIGAN (100). A cette première étape correspond une modification du comportement de la cellulose vis à vis des bases : il y a début de solubilisation ou "Alkali Swelling". Pour certains auteurs, le facteur capable de rompre la paroi externe et de provoquer ce début de solubilisation ou de gonflement, (Swelling), désigné par le terme de "S Factor" transformerait également la cellulose ramifiée en cellulose linéaire. Cette hypothèse n'est cependant pas confirmée par d'autres auteurs comme KOOIMAN (60).

Cette rupture de la paroi externe peut être accomplie également par voie mécanique ou chimique et se traduit toujours par l'augmentation de ce gonflement en présence des bases, et par une sensibilité plus grande aux colorants. Elle présente donc la première étape de la dégradation de la cellulose et peut même servir comme premier test de l'activité d'un filtrat cellulolytique.

Par suite de la rupture de la paroi externe, la structure interne tend à devenir plus lacunaire, et de ce fait plus accessible et plus hydratable. Cette modification de structure s'accompagne d'une diminution de la résistance de la fibre à la traction. Cette perte de résistance est en relation avec la rupture des structures transversales et spiralées observées par immersion de la fibre de coton dans un filtrat cellulolytique, comme l'ont montré BLUM et STAHL (7).

Il faut noter qu'à ces premières phases de l'attaque de la cellulose par un champignon cellulolytique correspond la formation d'une substance dégradée, soluble dans la soude mais insoluble dans l'eau. On a remarqué que la fibre ainsi attaquée présente de nombreuses perforations correspondant à ces premières zones de lyse. Le contact intime entre le substrat et le microorganisme cellulolytique est donc essentiel et il peut expliquer dans une certaine mesure la non diffusion de l'enzyme dans le milieu externe.

Parallèlement à cette transformation de la structure de la cellulose, REESE, TRIPP et SEGAL (102) ont noté une diminution du degré de polymérisation. Cette dépolymérisation s'accompagne de la formation de sucres réducteurs, alors que par action du "S Factor", seule la résistance à la traction était modifiée.

Ces différents stades de la dégradation : rupture de l'enveloppe externe, augmentation de la solubilisation, formation de sucres réducteurs permettront de suivre la dégradation d'un substrat, ou de déterminer l'activité d'un substrat cellulolytique.

D'autre part, ils montrent la modification de structure subie par la cellulose au cours de ces altérations successives et, partant de ces observations, on a préparé des substrats cellulosiques correspondant à ces différentes structures.

d - Celluloses solubilisées.

On a remarqué que toute modification physique ou chimique qui tend à réduire la structure cristalline de la cellulose, au profit d'une structure lacunaire amorphe, favorise l'hydratation et l'action enzymatique. Utilisant les caractéristiques de la structure de la cellulose, on peut réduire la longueur des chaînes par simple broyage, ou détacher les chaînes ramifiées de la chaîne principale, leur point de liaison à cette dernière étant particulièrement vulnérable. Ces produits, encore peu dépolymérisés, sont très hydratables et donnent des gels visqueux, qui par action de l'enzyme se solubilisent complètement.

Mais d'autres modifications peuvent être réalisées par voie chimique : les acides minéraux, acide sulfurique à 72 %, ou acide phosphorique à 85 %, utilisés respectivement par HARMSEN (41) et par HUNGATE (48), la soude utilisée par WALSETH (127) solubilisent et reprécipitent une cellulose qui est beaucoup plus sensible à l'action de l'enzyme que la cellulose initiale ; et l'action de l'enzyme se traduit alors par une solubilisation complète. Ainsi, cette cellulose colloïdale, maintenue en suspension dans un milieu gélosé, permet de déceler les zones de lyse correspondant au développement d'un microorganisme cellulolytique ou à l'action de l'enzyme, et elle cons-

titue un excellent milieu pour contrôler la pureté d'une souche , et son activité cellulolytique.

On peut également augmenter la solubilité de la cellulose par estérification des groupes OH de la molécule du glucose. On obtient ainsi des celluloses dites "substituées" qui sont aisément solubles. Chaque molécule de glucose possède trois OH estérifiables mais pratiquement on ne réalise qu'une seule estérification, et on utilise pour cela le monochloracétate de sodium. Ces celluloses sont désignées par le terme de C.M.C. : Carboxyméthylcellulose (Cell-O-CH2-COONa). Nous avons utilisé pour notre expérimentation la fabrication française des Etablissements NOVACEL, commercialisée sous le terme de Blanose et ne présentant qu'une seule substitution.

Il faut remarquer que cette substitution , si elle augmente la solubilisation de la cellulose, diminue par ailleurs sa réceptivité à l'enzyme.

Ces moyens physiques ou chimiques permettent de préparer toute une série de produits correspondants à des phases déterminées de la dégradation de la cellulose, et, en utilisant ces produits commercialisés, on a pu élucider une partie de tous ces mécanismes de la cellulolyse.

2 - MECANISMES ENZYMATIQUES DE LA DEGRADATION DE LA CELLULOSE.

Tous les microorganismes cellulolytiques capables de métaboliser la cellulose insoluble en ses composants les plus simples, cellobiose et glucose, solubles et assimilables par de nombreux autres microorganismes du sol, peuvent effectuer ce long métabolisme grâce à leur équipement enzymatique très caractéristique.

Si d'une part, les bactéries cellulolytiques anaérobies objet des premières recherches d'OMELIANSKY (89), si d'autre part, les bactéries cellulolytiques aérobies et en particulier les *Cytophaga* ont été étudiées par HUTCHINSON et CLAYTON (49), puis par WINOGRADSKY (134), STAPP et BORTELS (117), FAHRAEUS (29) et STANIER (118), les mécanismes enzymatiques propres à ces bactéries demeurent beaucoup moins connus que ceux des champignons cellulolytiques.

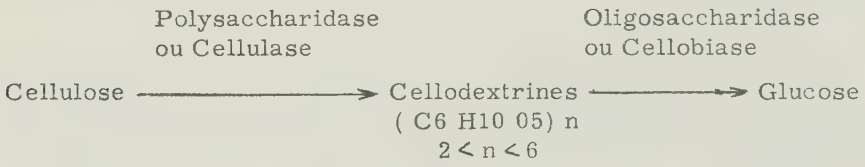
Aussi les principales acquisitions concernant l'étude de ces mécanismes sont dues aux nombreux travaux faits sur diverses espèces de champignons, obtenus aisément en culture pure, et produisant en grande quantité des enzymes.

Ces microorganismes sont capables d'abord, d'attaquer la cellulose naturelle fibreuse, de l'hydrater, de modifier sa structure ramifiée en une structure linéaire, puis de transformer ces chaînons dépolymérisés en sucres réducteurs élémentaires.

Différents schémas ont été successivement proposés mettant en évidence les deux grandes phases de cette transformation : solubilisation et formation de sucres réducteurs.

- SCHEMA DE PRINGSHEIM

PRINGSHEIM (97) a, le premier, souligné dès 1912 l'importance de ces éléments solubles qu'il désigne par le terme de "Cellodextrines" et qui sont des polymères formés d'au moins six molécules de glucose. Pour lui le schéma s'établit ainsi :



La transformation de la cellulose insoluble, en éléments solubles encore polymérisés, serait assumée par des Polysaccharidases, encore désignées par le terme de "Cellulases", puisqu'elles sont spécifiques de ce substrat. Les chaînes solubles seraient à leur tour métabolisées par des oligosaccharidases, et le chaînon le plus élémentaire de la transformation étant le cellobiose, on leur donne nom de "Cellobiases".

Ce premier schéma laisse donc supposer l'existence de deux grands groupes d'enzymes : l'un capable de métaboliser la cellulose à longues chaînes, et l'autre limitant son action à des dextrines dont il détache le glucose. Les produits de fin de réaction sont donc : le glucose, le cellobiose, et les oligosides supérieurs du cellobiose.

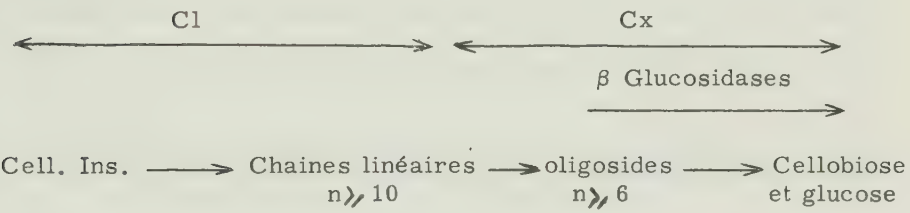
- SCHEMA DE REESE ET COLLABORATEURS.

Reprenant cette étude de la dégradation de la cellulose par voie enzymatique, REESE et ses collaborateurs ont souligné depuis une vingtaine d'années la multiplicité des enzymes ou des composants enzymatiques englobés sous le terme de Cellulases, qui tous assurent la transformation de la cellulose insoluble en sucres simples.

Mais l'utilisation des celluloses solubilisées, préparées comme on l'a précédemment envisagé, a permis de distinguer de nombreux composants de la cellulase, et REESE (103) a été amené à définir au sein même de ces cellulases deux grands groupes de facteurs enzymatiques :

- Facteur C1 : assurant la transformation de la cellulose insoluble en cellulose soluble, à chaînes linéaires, polymères formés d'au moins dix molécules de glucose.

- Facteur Cx : assurant la transformation des celluloses linéaires en sucres réducteurs ayant un degré de polymérisation compris entre une et six molécules de glucose. Les enzymes assurant cette dégradation sont groupés sous le nom général de β 1-4 glucosidases.



Ce qui amène donc à classer les microorganismes selon leur équipement enzymatique :

Microorg. métabolisant les polymères où $n < 6$ par leur Glucosidases

" " " $n < 10$ par le facteur Cx (Cellulase et Glucosidase)

" " la cellulose insoluble par les facteurs C1, Cx.

Il faut souligner que cette dernière catégorie de microorganismes, possèdant l'équipement complet C1 Cx, correspond à ces microorganismes désignés par WINOGRADSKY (134-135) comme cellulolytiques vrais, ou cellulolytiques au sens strict du terme ; ils s'opposent donc aux microorganismes, beaucoup plus nombreux, capables de métaboliser les celluloses solubles seulement, et donc limités par un équipement formé par le facteur Cx.

L'action des préparations enzymatiques, ou des filtrats bactériens ou fongiques acellulaires ne permet jamais une dépolymérisation et une solubilisation aussi complète que celle réalisée par les microorganismes in vivo. Il faudrait donc supposer que l'action de ce facteur C1 est liée à une action locale intensive du microroganisme, et

l'observation faite au microscope de l'attaque de la cellulose par un champignon ou par un *Sporocytophaga* intimement associé à son substrat confirmerait cette hypothèse.

Les travaux de REESE (103), KING (58-59), MILLER et BLUM (79), SISON, SCHUBERT et NORD (115), soit par chromatographie, soit par électrophorèse, confirment la présence des multiples composants de ce facteur Cx.

- SCHEMA DE STONE .

STONE (121) envisageant la biochimie de la cellulose sous ses deux aspects de biosynthèse et de dépolymérisation, suppose que le mécanisme qui assure la transformation des chaînes linéaires en sucres solubles et réducteurs doit être le même que celui qui assure la transformation de la cellulose insoluble en cellulose soluble.

Partant du schéma initial :

Cellulose Insol. $\xrightarrow[\text{Cellulases}]{}$ Cellobiose $\xrightarrow[\text{Cellobiases}]{}$ Glucose

STONE remarque les activités respectives de ces deux grands facteurs enzymatiques :

- La cellobiase active sur le cellobiose dont elle détache une unité de glucose terminal, non réducteur, est aussi active sur les chaînes plus longues ayant de deux à six molécules de glucose, et terminées par une molécule de cellobiose. Ce qui introduit, par extension de ce terme de cellobiase, le terme d'"Oligase". Cette même action de la cellobiase sur les oligosides avait été démontrée en 1933 par GRASSMAN (39).

- La cellulase active sur les chaînes insolubles et sur les premières chaînes solubles étend son action jusqu'au cellobiose, mais sa spécificité est beaucoup plus grande sur les longues chaînes, d'où le terme de "Polyase".

Polyase et Oligase renforcent leur action au niveau des polymères à six molécules de glucose, et leur action superposée aboutit à la formation de glucose, de cellobiose, et d'oligosides homologues supérieurs du cellobiose (cellotriose et cellotétraose).

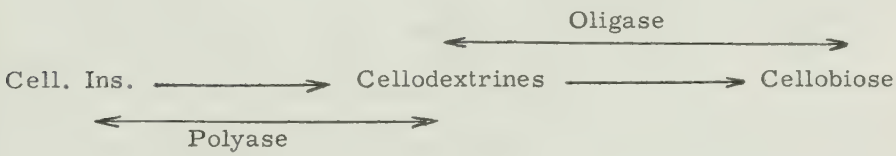
Confirmant les données de THOMAS (123) sur *Stachybotrys-atra*, STONE a résumé ce mécanisme par le schéma suivant :

- SCHEMA DE PETTERSON.

Les méthodes récentes de séparation sur colonnes de Séphadex ont permis à PETTERSON et PORATH (92) d'isoler à partir de culture de ***Polyporus versicolor*** des fractions enzymatiques dont ils ont contrôlé l'étroite spécificité vis-à-vis de substrats bien définis. Ils ont ainsi mis en évidence dans ces filtrats acellulaires :

- une glucosidase, agissant sur les oligosides à poids moléculaire bas, ou Oligase;

- des cellulases agissant sur des chaînes plus longues et insolubles, ou Polyases. Ce qui permet d'établir un schéma très voisin de celui de STONE (121) :



Une séparation plus poussée de ces composants cellulolytiques Polyase, et leur analyse chimique, fait apparaitre des spécificités étroites en fonction de leur structure.

Ces composants désignés B, C, D , actifs sur les cellobiosides et sur la cellulose, progressivement élués des colonnes, ont des poids moléculaires décroissants, de 50.000 à 11.000, et leur spécificité vis-à-vis de la cellulose augmente de B à D. On note que la fraction D, à poids moléculaire le plus bas, est la fraction la plus active sur les chaînes les plus longues.

D'autre part, l'analyse des acides aminés constitutifs de ces mêmes fractions B et D montre la présence de seize acides aminés, dont neuf seraient communs avec des concentrations sensiblement équivalentes dans l'une et l'autre de ces fractions. Ce qui laisse supposer qu'il y aurait des unités communes de polypeptides dans ces

deux fractions. La teneur en glucides, de 1 % en poids dans la fraction B, est de 33% pour la fraction D.

Cette communauté de structure et cette communauté d'activité enzymatique, les différences secondaires étant en relation avec les spécificités de substrat, suggèrent que cette dégradation de la cellulose pourrait se faire par une série d'enzymes agissant de façon séquentielle en fonction de leur poids moléculaire : les enzymes à poids moléculaire élevé, du type glucosidase, agissant sur les substrats les plus élémentaires, alors que les substrats plus polymérisés seraient attaqués par les enzymes à poids moléculaire plus faible.

Conclusions :

Si les différents schémas proposés successivement par PRINGSHEIM (97), REESE (103), STONE (121), PETTERSON (92), traduisent les principales étapes de ce long mécanisme, et font apparaitre les différents éléments enzymatiques de la réaction, ils permettent de souligner dans tous les cas la progression régulière de ce mécanisme tant par l'évolution de son substrat, que par celui de toute la série de constituants ou facteurs enzymatiques qui la réalisent.

Ce substrat homogène, uniquement formé de molécules de glucose réunies entre elles en 1-4, selon l'arrangement même du cellobiose, considéré comme l'unité constitutive de la cellulose, peut, par un même mode de réaction, et par un même type d'enzymes être décomposé en ses plus simples éléments constitutifs.

Si pour certains auteurs il existe donc de multiples facteurs ou composants enzymatiques, si au contraire, pour d'autres, il ne s'agit que d'un seul enzyme (WHITAKER 132), on peut à la lumière des données récentes envisager qu'il s'agit d'une série d'éléments enzymatiques du même type, dont les poids moléculaires sont en raison inverse de ceux des substrats à métaboliser.

Les éléments enzymatiques agissant sur les chaînes insolubles et sur les chaînes solubles les plus longues, dont elles détachent le cellobiose, agissent donc comme des cellobiosidases, et libèrent des homologues supérieurs de ce cellobiose. On peut les désigner par le terme de "Cellulases" éléments des Polyases.

Au contraire, les chaînes solubles sont hydrolysées par des glucosidases qui en libèrent du glucose ; mais du fait même que leur action ne peut avoir lieu que si la chaîne possède un site cellobiose , on leur donne nom de Cellobiase.

Cellulases et cellobiases, agissant en tant que polyases et oligases, superposent leur action au niveau des chaînes à six molécules de glucose, et contribueront à la formation de glucose, cellobiose et oligosides supérieurs, éléments caractéristiques de ce long métabolisme.

Au laboratoire, on peut suivre ce phénomène de dégradation de la cellulose et en caractériser les phases essentielles. En effet :

- la première étape, qui correspond à la rupture de l'enveloppe externe de la microfibrille, se traduit par une perte ou par une diminution de la résistance de la fibre à la traction.

- la transformation des chaînes ramifiées en chaînes facilement hydratables permet, jusqu'à leur parfaite solubilisation, des mesures viscosimétriques.

- la dépolymérisation de cette longue molécule s'accompagne de la formation de sucres réducteurs : glucose, cellobiose, oligosides supérieurs, formés de deux à six molécules de glucose ; ces sucres peuvent donc être l'objet de déterminations quantitatives et qualitatives.

oOo

B - ETUDE SOMMAIRE DES SPOROCYTOPHAGA MYXOCOCCOIDES

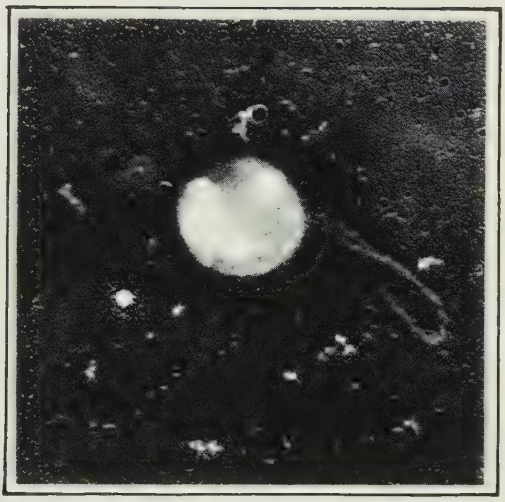
Lorsqu'en 1929, WINOGRADSKY (134) étudiant la microflore cellulolytique du sol, avait été frappé par la présence de germes intensément pigmentés en jaune, muqueux, capables de métaboliser activement la cellulose du papier, il en avait fait la description suivante :

" Ce qui attire l'attention déjà, dans les préparations faites avec un flocon arraché d'une tache jaune à peine naissante, c'est la densité et la régularité de la disposition des cellules sur les parois des fibres attaquées ; ils y forment un revêtement régulier, composé d'individus logés parallèlement et orientés dans la même direction. On y observe souvent des tableaux frappants qui paraissent démontrer qu'ils s'y fixent en s'adaptant en quelque sorte à la structure de la membrane qu'ils garnissent. Ainsi, s'ils habillent une fibre dont les parois ont une structure spiralée, on les voit dans la direction de la spirale, par exemple de gauche à droite sur la paroi supérieure de la fibre couchée devant l'observateur, mais de droite à gauche en suivant toujours le tour de la spirale du côté opposé".

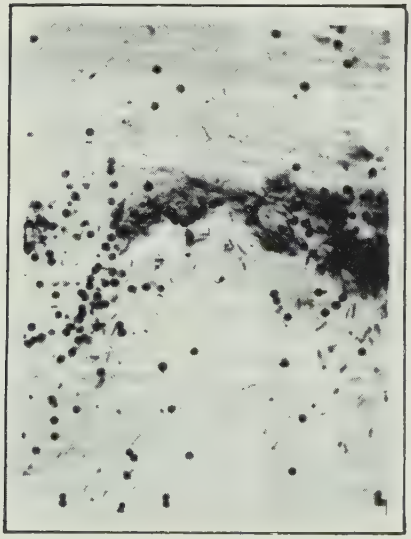
Cette description imagée doit retenir notre attention car elle résume les principaux caractères de ces germes : *Cytophaga* et *Sporocytophaga*, soulignant leur morphologie et leur capacité de s'adapter parfaitement sur le substrat à métaboliser.

Après les premières études de HUTCHINSON et CLAYTON (49), de WINOGRADSKY (134), de KRZEMIENIEWSKA (63), de STAPP et BORTELS (117), les travaux de STANIER (118) et ceux de FAHRAEUS (29) ont apporté une connaissance beaucoup plus approfondie de la morphologie, de la nutrition carbonée, et aussi de la position taxonomique de ces germes parmi les Procaryotes.

1 - Sporocytophaga myxococcoïdes, forme végétative âgée de 3 jours Grossissement = 25.000 (microscope électronique)



2 - Sporocytophaga myxococcoïdes, microcyte jeune Grossissement = 25.000 (microscope électronique).



3 - Sporocytophaga myxococcoïdes, Culture stationnaire sur coton cardé après 5 jours à 28°. Formes végétatives, microcystes en formation et microcystes mûrs. Grossissement - 800 (contraste de phase).

1 - Morphologie.

Une distinction fondamentale s'impose dans la description des *Cytophaga* et des *Sporocytophaga* . Ces deux microorganismes se présentent en phase exponentielle comme des bactéries longues et minces, effilées, à extrémités arrondies, de 5 µ de long et de 0,8 µ de large, peu réfractiles ; mais dans le cas du *Sporocytophaga* , en plus de cette forme végétative effilée, on remarque dans les cultures âgées de quelques jours des formes rondes très colorables de 1,8 à 2 µ de diamètre, ayant tendance à s'agglutiner et pour lesquelles on a adopté le terme de "microcyste".

Cytophaga et *Sporocytophaga* , à forme végétative du même type , se différencient donc morphologiquement par la présence de ce microcyste propre au *Sporocytophaga*.

Cette forme végétative longue et mince du *Sporocytophaga*, possède comme celle du *Cytophaga* une autre propriété qui est son caractère flexueux et souple. La paroi bactérienne, élément caractéristique des bactéries auxquelles elle confère leur rigidité, présente chez tous les Procaryotes (STANIER 119) peut dans certains cas avoir subi des modifications ou être réduite, ce qui explique le caractère déformable de la forme végétative remarqué non seulement chez les Cytophagaceae, mais aussi chez les Myxobactéries.

Cette souplesse donne par ailleurs aux *Cytophaga* une aptitude très grande pour s'appliquer sur le substrat, d'où cette image de WINOGRADSKY (134) "des germes qui habillent toutes les fibres". Ce phénomène a été défini par le terme d'"Elasticotaxis" par STANIER (118) et se retrouve appliqué à d'autres germes qui peuvent aussi s'adapter à des substrats à grosses molécules. La cellulose, macromolécule insoluble, en raison de son ultrastructure forme des stries sur lesquelles les formes végétatives souples et déformables des *Sporocytophaga* viennent se fixer, et dont elles reproduisent fidèlement la structure. D'autre part, ce contact intime permet aussi d'expliquer le premier temps de l'attaque de la cellulose par les *Sporocytophaga* , attaque liée à l'étroite superposition substrat et microorganisme, sans dispersion d'enzyme hors du substrat.

D'abord considéré comme un contaminant, "Coccoïde", le microcyste a une place bien définie dans le cycle de reproduction du *Sporocytophaga* . Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer sa formation:

- Pour KRZEMIENIEWSKA (63) la forme végétative se raccourçit, puis la chromatine se réduit, et le microcyste prend sa forme sphérique dont les enveloppes s'épaisissent rapidement par accumulation de mucopolyosides. Cette formation du microcyste a été rapprochée alors, de celle beaucoup plus connue du microcyste des Myxococaceae d'où le nom donné dès lors au *Sporocytophaga myxococcoïdes*.

- Pour BISSET (5) et GRACE (38) il s'agit au contraire d'un processus rencontré aussi chez les bactéries vraies non sporulées (E. Coli et Proteus). La cellule végétative à deux paires de chromosomes par fusion autogamique et réduction nucléaire donne une cellule haploïde, arrondie, qui au moment de la germination, après une division nucléaire redonnera une cellule végétative à deux paires de chromosomes.

La reproduction des *Sporocytophaga* peut donc se faire classiquement par division, par constriction ou par l'intermédiaire de la forme microcyste, ce dernier ne pouvant être confondu avec une spore dont il ne possède pas les caractéristiques : résistance à la chaleur et à la dessiccation.

Un autre caractère propre à la forme végétative de ce microorganisme et qui le différencie des Eubactéries, est la mobilité, puisqu'elle est assurée par un glissement "Creeping" selon le terme adopté par STANIER (118) ; l'absence de cils et de flagelles ayant été confirmée par examen au microscope électronique par LOEBECK et ORDAL (68). Cette locomotion qui correspond à une reptation à la surface d'un substrat solide, propre aux Myxobactérie ne connait actuellement encore pas d'explication satisfaisante : attribuée à la présence d'une grande quantité de mucus par JAHN (53) cette théorie a été combattue par MEYER-PIETSCHMANN (76-77) et on admet plus aisément aujourd'hui, qu'il s'agisse de contractions des corps cellulaires, longs et souples comme le propose BISSET (6).

Par leur morphologie caractéristique, ces germes longs et flexueux, à paroi sans rigidité, capables de se déplacer par des contractions, sécrétant un mucus abondant, et pouvant prendre une forme sphérique de microcyste se rapprochent beaucoup plus des Myxobactéries que des bactéries vraies.

2 - Nutrition :

Si l'azote organique n'est tolérée que sous forme d'urée et de peptone (1 %), les seuls acides aminés métabolisables sont l'acide aspartique et la méthionine ; glycine, alanine, leucine et acide glutamique ne peuvent être métabolisés. D'autre part, il faut remarquer que l'azote organique ne peut à la fois servir de source de carbone et d'azote, il faut toujours pour que la bactérie se multiplie une source carbonée ayant la structure des glucides en β 1-4. La meilleure source azotée est minérale, soit sous forme de nitrates, soit sous forme d'ion NH_4.

Les facteurs de croissance : extrait de levure ou extrait de terre, seraient nécessaires pour HARMSEN (41) ; pour d'autres auteurs, seulement la thiamine serait stimulante (DROZDOWICZ 26).

- La nutrition carbonée est caractéristique de ces germes, qui ne peuvent métaboliser que les glucides en β 1-4. Le glucose même a semblé longtemps ne pouvoir être métabolisé ; c'est à STANIER (118) que l'on doit la mise en évidence de ce métabolisme du glucose, à condition que ce dernier soit stérilisé par filtration sur bougies (la stérilisation par autoclavage à 110° entrainant la formation de produits toxiques inhibiteurs).

Le cellobiose, biose à liaison β 1-4 peut aussi être métabolisé, et certaines souches métabolisent le mannose (FAHRAEUS 29-30). Mais la cellulose reste la source de carbone préférentielle pour ces germes, d'où leur définition de cellulophages obligatoires donnée par WINOGRADSKY (135). Néanmoins, ils peuvent métaboliser les celluloses solubles et la cellulose colloïdale de HARMSEN (41).

Cette nutrition carbonée très particulière implique donc l'existence de mécanismes enzymatiques spécifiques de ce substrat cellulose.

3 - Formation du Mucopolyoside .

Si WINOGRADSKY (134) avait souligné la morphologie des *Cytophaga* , l'attaque du substrat par la cellule bactérienne il avait aussi souligné la formation importante d'un mucus jaune. Ce mucus était pour lui une étape dans la dégradation de la cellulose, il le désignait comme une "Oxy-cellulose", supposant que tout ce mécanisme de dégradation se faisait par un processus oxydatif.

En fait, ce sont les travaux de NORMAN et FULLER (87) et surtout ceux de FAHRAEUS (29) qui ont démontré que ce mucus n'était pas un stade dans le processus de dégradation, mais un produit de synthèse, cette synthèse pouvant se faire à partir de sucres simples glucose et cellobiose et en l'absence de cellulose.

Cette étude sommaire des *Sporocytophaga* nous permet de souligner les principaux caractères de ces microorganismes :

- Ces microorganismes Procaryotes constituent une transition entre les Eubactéries et les Myxobactéries dont ils possèdent la forme végétative, mais s'en différencient par l'absence de fructifications ; le microcyste ne pouvant en aucun cas être considéré ou confondu avec une fructification.

- La nutrition carbonée ne peut s'expliquer que par un équipement enzymatique permettant une dégradation complète d'un substrat insoluble en éléments simples solubles et métabolisables par la cellule.

- La formation de mucus entourant la cellule bactérienne ou le microcyste témoigne d'un mécanisme de synthèse à partir des éléments de fin de dégradation.

Ces données nous permettent d'envisager l'étude de ce mécanisme d'hydrolyse de la cellulose par les *Sporocytophaga* avec ses phases essentielles, sur la cellulose insoluble, sur les celluloses solubles et sur les oligosides, d'en rechercher les conditions d'action et de caractériser les fractions enzymatiques qui en sont responsables.

Ces produits de synthèse étant formés à partir des éléments de dégradation , existe-t-il une relation entre ces éléments et les fractions enzymatiques responsables de cette dégradation ?

La première partie de nos recherches sur l'équipement enzymatique sera donc consacrée à l'étude de ces mécanismes de dégradation.

oOo

C - TECHNIQUES UTILISEES

1 - La souche .

Nous avons utilisé pour notre expérimentation une souche américaine de *Sporocytophaga* , qui nous a été très aimablement transmise par Messieurs REESE et LEVINSON. Cette souche a été purifiée par les méthodes classiques de HARMSEN (41) et de STANIER (118), à savoir sur gélose à la cellulose colloïdale, et sur gélose glucosée.

a - Purification par la méthode de HARMSEN (41).

La méthode de HARMSEN (41) est fondée sur les propriétés lytiques des *Sporocytophaga* . Ce germe ensemencé sur un milieu contenant une cellulose colloïdale dispersée rendant le milieu opaque, au cours de son développement, lyse le substrat cellulosé, et cette lyse se traduit par la clarification du milieu.

La cellulose colloïdale précipitée de HARMSEN (41) est obtenue par hydrolyse du coton hydrophile par l'acide sulfurique :

On verse sur 10 g de coton hydrophile dilacéré l'acide sulfurique dilué (200 ml d'acide et 120 ml d'eau) dont la température est de 60°. On laisse l'hydrolyse se produire pendant 15'' et on l'arrête par l'addition de 3 litres d'eau versés en une seule fois. La cellulose précipite, on décante et lave à plusieurs reprises, et le précipité est dialysé pendant deux à trois jours contre l'eau courante, jusqu'à neutralisation complète. On détermine la concentration en cellulose de cette suspension, par préparation d'un extrait sec. La gélose à la cellulose colloïdale est préparée à partir du milieu minéral de base auquel on ajoute la cellulose précipitée à la concentration de 2 g °/₀₀, la gélose DIFCO étant à la concentration de 8 °/₀₀ (concentration favorable à la mobilité des germes). Le milieu est stérilisé à 120° pendant 30'.

L'ensemencement de ce milieu de purification se fait dans la masse à 45°, avec la suspension bactérienne à purifier. Le milieu est ensuite coulé en boites de PETRI et mis à incuber à 28°. Il est nécessaire de faire plusieurs dilutions bactériennes de façon à obtenir des colonies très isolées. Après une dizaine de jours d'incubation, on remarque l'apparition de zones claires, transparentes, contrastant avec le milieu originel opaque. Ces plages claires correspondent au développement d'une colonie bactérienne. On peut aisément prélever cette zone de lyse et la transférer sur une gélose minérale-papier. Cette gélose est préparée avec le milieu minéral de base, gélosé à 8 °/₀₀, les géloses sont inclinées et on dépose sur la surface une bande de papier filtre stérile DURIEUX. C'est sur ce milieu minéral-papier que va se développer la culture provenant du repiquage d'une colonie isolée de la gélose de HARMSEN.

Après trois à quatre jours d'incubation à 28°, la culture se développe et se pigmente en jaune. Un contrôle au microscope permet de noter la présence de très nombreuses formes végétatives, et l'absence de contaminants. Cette absence de contaminants est également vérifiée par ensemencement de la culture sur une gélose nutritive sur laquelle seuls les contaminants peuvent se développer.

Après ces contrôles on fait par sécurité une autre purification par la méthode de STANIER (118) sur gélose glucosée.

b - Purification par la méthode de STANIER (118).

Les difficultés essentielles de purification des bactéries cellulolytiques étaient dues au fait que le substrat cellulosé : bandes de papier filtre utilisées par WINOGRADSKY (134), ou cellulose du coton ne permettait pas l'obtention de colonies isolées. La méthode de HARMSEN (41) permet déjà d'isoler ces colonies sur un milieu à la cellulose ; la méthode de STANIER (118) utilisant un milieu minéral gélosé et glucosé à 2 °/₀₀ ensemencé par la méthode classique d'épuisement en stries, permet aussi l'isolement de colonies.

On ensemence ce milieu avec la culture obtenue sur le milieu de HARMSEN. Après cinq à six jours d'incubation à 28° apparaissent des colonies jaunes muqueuses présentant le phénomène de "Swarming" précèdemment décrit. La pureté de cette culture est à nouveau contrôlée sur gélose nutritive, et on repique cette culture pure sur une gélose minérale-papier sur laquelle elle peut être entretenue et conservée. Il est conseillé de faire ces purifications sur les deux milieux proposés : gélose de HARMSEN et gélose glucosée.

Des méthodes utilisant les antibiotiques, et en particulier la Kamycine, ont été préconisées ces dernières années. RIVIERE (106) a utilisé cet antibiotique pour éliminer un arthrobacter contaminant

fréquent des *Sporocytophaga* et *Cytophaga*. Il nous semble que cette méthode rende la souche moins muqueuse et nous avons utilisé de préférence les méthodes de HARMSEN et de STANIER.

La pureté de la souche doit être soigneusement contrôlée avant chaque ensemencement.

2 - Milieux de Culture .

Le milieu de culture est un milieu minéral , enrichi par une très petite quantité d'extrait de levure auquel on ajoute une source carbonée, soit insoluble, (coton cardé ou cellulose broyée), soit soluble (cellobiose ou glucose). Diverses formules pour la composition de ce milieu minéral avaient été successivement utilisées par OMELIANSKY (89), HUTCHINSON et CLAYTON (49), WAKSMAN et CAREY (125), STANIER (118) et FAHRAEUS (29) différant essentiellement les unes des autres par la nature de la source azotée minérale.

Des modifications ont été apportées à ces milieux par l'addition de facteurs de croissance à l'état de traces (HARMSEN 41 avait démontré en 1946, la nécessité de la présence de ces facteurs), et aussi par utilisation de mélange tampon phosphaté. Le milieu que nous avons utilisé a la composition suivante:

Nitrate de sodium	2 g
Sulfate de magnésium, 7 H20	0,5 g
Chlorure de calcium, 2 H20	0,5 g
Sulfate de manganèse, 7 H20	0,1 g
Sulfate ferrique, 7 H20	0,02 g
Phosphate monopotassique 0,5 M	20 ml
Phosphate disodique 0,5 M	80 ml
Extrait de levure Difco	0,02 g
Eau distillée Q.S. pour	1000

Les sels sont soigneusement mis en solution, et le pH ajusté à 7,2, avant l'addition du mélange tampon phosphate.

Les cultures sont faites dans des fioles FOURNEAU, de 1.000 ml, au fond desquelles on dépose le coton cardé (200 mg) en couche mince qu'on imprègne par 20 ml de la solution minérale précédente. La stérilisation est de trente minutes à 120°.

La cellulose broyée utilisée, à la place du coton cardé, est une cellulose de coton (Filtramass des Etablissement NOVACEL); on l'emploie dans les mêmes conditions que le coton cardé mais à la concentration de 100 mg dans 20 ml de solution minérale.

Lorsque les cultures sont faites en présence de substrat soluble : cellobiose ou glucose, la solution minérale est stérilisée dans les mêmes conditions que précèdemment, et on ajoute extemporanément la solution de glucides , stérilisée par filtration sur bougie. On ensemence ces milieux par une suspension épaisse de bactéries de cinq à sept jours, l'inoculum devant être assez important en raison même des facteurs de croissance qu'il renferme (FAHRAEUS 29).

Les cultures placées à l'étuve à 28° et non agitées, se pigmentent en jaune après cinq à six jours, et parallèlement à la décomposition de la cellulose, il se forme un mucus abondant.

Les examens microscopiques faits après trois à quatre jours de culture, et après huit jours mettent en évidence le cycle morphologique de ces germes, présentant uniquement des formes longues et minces au premier examen, tandis qu'au deuxième, on note la formation progressive des kystes, plus spécialement groupés sur les fibres de coton. La pureté de chaque fiole est contrôlée par un ensemencement de gélose nutritive sur laquelle seuls les contaminants pourraient se développer.

3 - Préparation des produits à étudier.

Au cours de cette première série d'expériences, nous avons utilisé des cultures brutes concentrées ; elles ont été obtenues par expression de la culture de son substrat. Dans le cas du coton cardé, celui-ci est trituré au mortier, épuisé par de l'eau stérile, de façon à débarrasser les fibres de tous les germes qu'elles peuvent fixer, et la suspension de germes ainsi obtenue, est évaporée à 20°, sous vide, jusqu'à l'obtention d'un volume égal au tiers du volume initial ensemencé.

Cette suspension peut être conservée à la glacière en présence de merthiolate (Ethylmercurithiosalicylate de sodium).

Dans le cas d'une expérimentation faite avec des filtrats acellulaires, la séparation des bactéries ne peut se faire que par une ultracentrifugation : 35.000 G pendant 15' pour les cultures jeunes, suivie d'une seconde centrifugation après lavage des culots bactériens par une solution tampon pH 7,5, dans les mêmes conditions lorsqu'il s'agit de cultures de douze à quinze jours muqueuses.

Les bactéries ainsi séparées peuvent également être soumises à une désintégration aux ultra-sons pendant quinze minutes ; le désintégrateur M.S.E. utilisé, lysant dans ces conditions les bactéries, mais n'altérant pas les microcystes.

4 - Tests d'activité enzymatique.

a - Principe .

Nous avons choisi comme test de l'activité enzymatique, la formation de sucres réducteurs à partir d'un substrat insoluble ou soluble, cette méthode permettant la détermination quantitative et qualitative des sucres, produits témoins de l'action enzymatique. Conformément aux schémas de dégradation de la cellulose, nous pouvons successivement examiner cette action enzymatique à partir :

- d'un substrat insoluble : cellulose broyée ;

- d'un substrat soluble : Blanose, dont on peut faire varier les degrés de polymérisation et de substitution ;

- d'osides simples, qui peuvent être des holosides : cellobiose, ou des hétérosides, du type arylglucoside : salicoside.

Ceci permet donc la mise en évidence de :

- l'action cellulase (Cl Cx), s'étendant des chaînes insolubles jusqu'au cellobiose ;

- l'action des oligoglucosidases (Cx) ayant comme substrat une cellulose soluble encore très polymérisée ;

- l'action des β glucosidases agissant sur des glucides peu polymérisés.

b - Milieux de réaction :

- Dans le cas d'un substrat insoluble, nous avons utilisé la cellulose broyée de NOVACEL, dans les conditions suivantes :

Cellulose insoluble	0,100 g
Solution tampon pH 7,5, 0,06 M	10 ml
Merthiolate	0,002 g
Solution enzymatique	2 ml
Eau distillée q.s. pour	20 ml

- Substrat cellulose soluble :

Les blanoses NOVACEL, R195, R190, R130, R105, nous ont permis d'une part d'utiliser des substrats de polymérisation décroissantes, pour une même substitution (les deux chiffres de droite exprimant la polymérisation, et le chiffre des centaines exprimant dans ces références le degré de substitution) ; et d'autre

part d'utiliser des substrats R095 et R195 et R395, à substitution variable pour une polymérisation constante.

Les substrats très polymérisés étant difficilement solubles, il est préférable de les solubiliser par entrainement au mixer, pendant 30 " en présence de la solution tampon phosphate. Nous avons utilisé les concentrations suivantes :

Blanose à 1% en solution tampon 0,06 M	8 ml
Merthiolate	0,001 g
Solution enzymatique	1 ml
Eau distillée q.s. pour	10 ml

L'incubation se fait soit à 37° pendant trois heures, soit à 28° pendant 20 heures, pour le test sur Blanose, et pendant 5 jours à 37° pour les tests sur cellulose insoluble.

- Substrats pour recherche de l'activité de β Glucosidase.

Pour rechercher l'activité de la β glucosidase, on dispose de deux substrats de réaction : soit un holoside tel que le cellobiose, soit un arylglucoside comme le salicoside. PIGMANN (93) avait en effet remarqué une spécificité différente selon l'origine de la glucosidase, pour les deux types de substrat. La mise en évidence de cette activité peut se faire par l'augmentation du pouvoir réducteur ou mieux, par détermination du glucose libéré, par dosage enzymatique à la glucose-oxydase.

La recherche de l'activité cellobiasique, se fait sur le cellobiose à concentration de 1 °/₀₀, en milieu tampon 0,02 M à pH 5,5. La recherche de l'activité β glucosidasique sur un arylglucoside du type salicoside, se fait dans les mêmes conditions, le salicoside étant à la concentration de 3,5 °/₀₀. Ces milieux de réaction, en présence de l'échantillon à examiner, sont mis à incuber pendant deux heures à 37°, le glucose libéré étant dosé spécifiquement par la glucose-oxydase.

c - Dosage quantitatif des sucres réducteurs.

Nous avons déterminé les sucres réducteurs produits par l'action des enzymes sur un substrat insoluble ou soluble, par la méthode de SUMNER et SOMERS (122) modifiée par BOREL et ses collaborateurs (8), et le glucose par la méthode enzymatique avec la glucose-oxydase.

α - Méthode de SUMNER et SOMERS (122) modifiée par BOREL (8).

Les sucres sont dosés au spectrophotomètre, en milieu alcalin, par la réduction du réactif dinitro-salicylique préparé selon BOREL (8) :

- Solution d'acide 3-5 dinitrosalicylique :

Sel de SEIGNETTE	255 g
Soude à 4,5 %	300 ml
Acide 3-5 dinitrosalicylique (MERCK) en solution à 1 %	880 ml

- Solution de Phénol :

Phénol	10 g
Soude à 10 %	22 ml
H20 q.s. pour	100 ml

On mélange les deux solutions et après un contact de quarante huit heures on les filtre.

- Technique de dosage :

Dans un tube de Pyrex jaugé de 25 ml, on mélange :

Solution de glucide à doser (0,1 à 0,5 mg)	1 à 2 ml
Réactif dinitrosalicylique	3 ml
Soude 6 N	2 ml
Solution de sel de SEIGNETTE à 50 %	1 ml

Ce mélange est porté au bain-marie bouillant pendant dix minutes exactement, et refroidi brusquement. On ajuste à un volume de 25 ml, par addition d'eau distillée, avant de faire la lecture de la densité optique au spectrophotomètre à 500 m μ. Faire parallèlement une gamme étalon avec des concentrations en glucose de 0,1 à 1,5 mg. Cette méthode permet le dosage de sucres réducteurs en présence de polysaccharides non réducteurs, et le pouvoir réducteur est exprimé en mg de glucose.

β - Dosage du glucose par la méthode à la Glucose-oxydase (GLUCOSTAT, WORTHINGTON. Biochemical Corporation).

Le glucose est oxydé spécifiquement par la glucose-oxydase en acide gluconique, avec libération d'H_2O_2, mise en évidence par un

chromogène qui permet une lecture au spectrophotomètre à 400 mμ

- Réactifs : pratiquement on utilise 0,10 ml de solution de glucose témoin (à 1,5 - 0,75 et 0,25 °/oo), ou de la solution à étudier, et on ajuste à 2 ml avec de l'eau distillée. La solution de Glucose-oxydase et de chromogène, est préparée extemporanément et ajoutée à raison de 2 ml par tube de réaction. Après un contact de 10', on arrête la réaction par addition de 2 ml d'acide chlorhydrique 4N. La lecture est faite au spectrophotomètre à 400 mμ .

La détermination du glucose dans les solutions à l'étude est faite selon le même protocole. Cette méthode spécifique permet de déceler le glucose présent dans les produits de dégradation à de très faibles concentrations (0,025mg/ml).

d - Détermination qualitative des sucres réducteurs par Chromatographie.

Si dans certains cas, on peut recourir à l'ancienne méthode des osazones (HASSID 44) permettant de distinguer les osazones des mono et des bisaccharides par leur solubilité à chaud, et par examen microscopique de leur cristallisation, l'identification du glucose, du cellobiose et des oligosides, se fait par chromatographie sur papier.

Nous avons utilisé la chromatographie descendante sur papier ARCHES 310, avec les solvants suivants :

- SOLVANTS :

n° 1 - Butanol-pyridine-eau : 6-4-3
n° 2 - Propanol-acètate d'éthyle-eau : 6-1-3
n° 3 - Acétate d'éthyle-acide acètique-eau: 9-2-2

Le solvant 1 permet une bonne séparation des oligosides de poids moléculaire bas (biholosides) ; le solvant 2 au contraire sépare bien les oligosides de poids moléculaire élevé (triholosides et tétraholosides) le solvant 3 sépare les oligosides et les acides uroniques.

- REVELATEURS :

La révélation a été faite avec les révélateurs suivants :

1 - Révélateur de PETEK selon COURTOIS et PERCHERON (21) : β naphtylamine-thymol (0,10 de β naphtylamine + 1 g de thymol + 2 ml d'acide orthophosphorique dans 150 ml d'alcool à 80°. Chauffage de trois minutes à 112°.

2 - Révélateur de JEANES (54) dinitrosalicylique : 0,5 g d'acide 3-5 dinitrosalicylique + 4 g de soude en pastilles pour 100 ml d'eau distillée . Chauffage de 4 à 5 minutes à 100°.

3 - Révélateur de SCHWIMMER et BEVENUE (110) : aniline - diphénylamine - phosphorique : 4 ml d'aniline + 4 g de diphénylamine dans 200 ml d'acétone + 20 ml d'acide orthophosphorique à 80 % . Chauffage de 4 à 5 minutes à 80 °.

Ces trois révélateurs permettent de mettre en évidence les sucres réducteurs et les acides uroniques :

- les sucres réducteurs donnent une coloration brune avec le réactif de JEANES ;

- le révélateur de PETEK (21) permet de caractériser les hexoses à fonction réductrice aldéhyde ou cétone, les pentoses et les acides uroniques ;

- le révélateur de SCHWIMMER (110) permet de distinguer les liaisons entre les molécules de glucose des aldo-hexoses ; la liaison 1-4 se colorant en bleu, la liaison 1-3 en beige, la liaison 1-6 en gris bleu, la liaison 1-2 en jaune. Le glucose étant coloré en bleu vert;

- la révélation des esters phosphoriques se fait en deux temps . Modifications de la méthode HANES et ISHERWOOD (40) :

α - imprégnation du chromatogramme séché à 80° par immersion selon la technique de BURROWS et GRYLLS et HARRISSON (12), dans le réactif molybdique (molybdate d'ammonium 1 g dans 8 ml d'eau + 3 ml d'acide chlorhydrique concentré + 3 ml d'acide perchlorique à 70 %, compléter à 100 ml avec de l'acétone).

β - hydrolyse de la liaison phosphoryle et réduction du complexe phosphomolybdique par exposition à la lumière solaire (30' à 5 heures) selon la technique de BOULANGER et MONTREUIL -10). Le phosphore minéral se colore en jaune verdâtre et le phosphore d'origine organique en bleu.

oOo

D - RESULTATS

Nous avons cherché à faire une étude comparative de l'activité d'un centrifugat de culture acellulaire concentrée, sur un substrat insoluble et sur un substrat soluble, et nous avons pour les recherches quantitatives et qualitatives, suivi le protocole précèdemment exposé.

Par les méthodes quantitatives, nous avons déterminé les conditions optima de cette activité sur la cellulose insoluble et sur la blanose, en fonction des variations de pH, de température, de concentration et de durée de réaction.

L'étude qualitative nous a permis, par l'identification des produits de fin de réaction, de comparer l'action enzymatique sur des substrats ne différant que par leur structure physique, et de suivre l'apparition de ces produits de fin de réaction, en particulier celle du glucose, et celle du cellobiose.

I - DETERMINATIONS QUANTITATIVES DE L'ACTIVITE D'UNE CULTURE EN FONCTION DU pH, DE LA TEMPERATURE, DE LA DUREE DE REACTION, ET DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT.

A - SUBSTRAT INSOLUBLE.

1 - Variations quantitatives en fonction du pH (Fig. 1)

Utilisant le protocole précèdent sur des milieux de réaction dont les pH sont de : 5,5 - 6,5 - 7,5 et 8,5 (obtenus par mélange des solutions tampon Na H_2PO_4 et Na_2HPO_4 0,06 M) nous avons déterminé les sucres réducteurs formés par l'action d'un centrifugat de culture (culture ayant pour substrat le coton cardé) et concentrée sous vide à 20°. Les milieux de réaction sont mis à incuber à 28° pendant cinq jours. Après ce temps, la cellulose résiduelle est éliminée par centri-

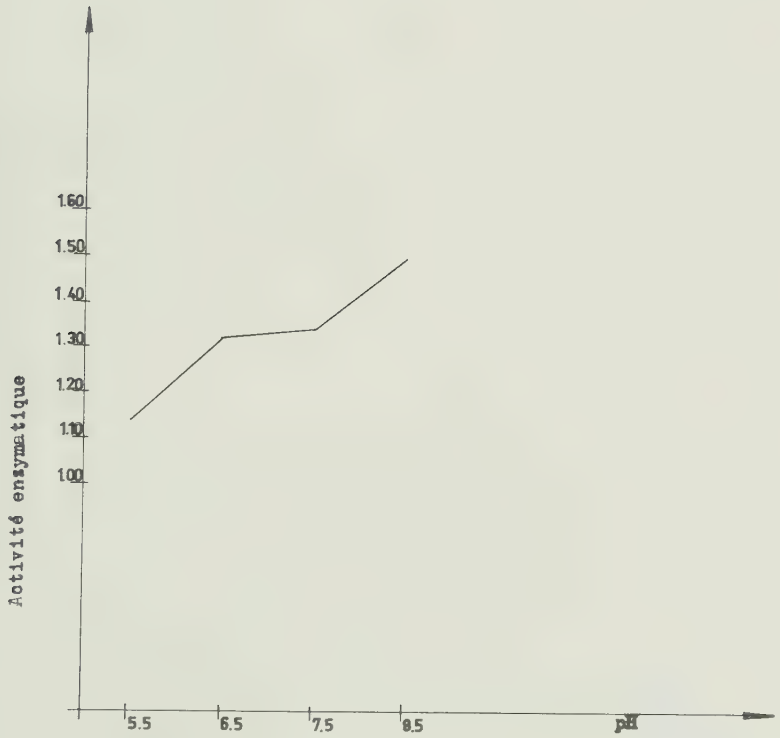


Fig. 1 .
Influence du pH sur l'activité enzymatique des Sporocytophaga . Activité enzymatique=mg./ml/5J. Substrat : Cellulose broyée .

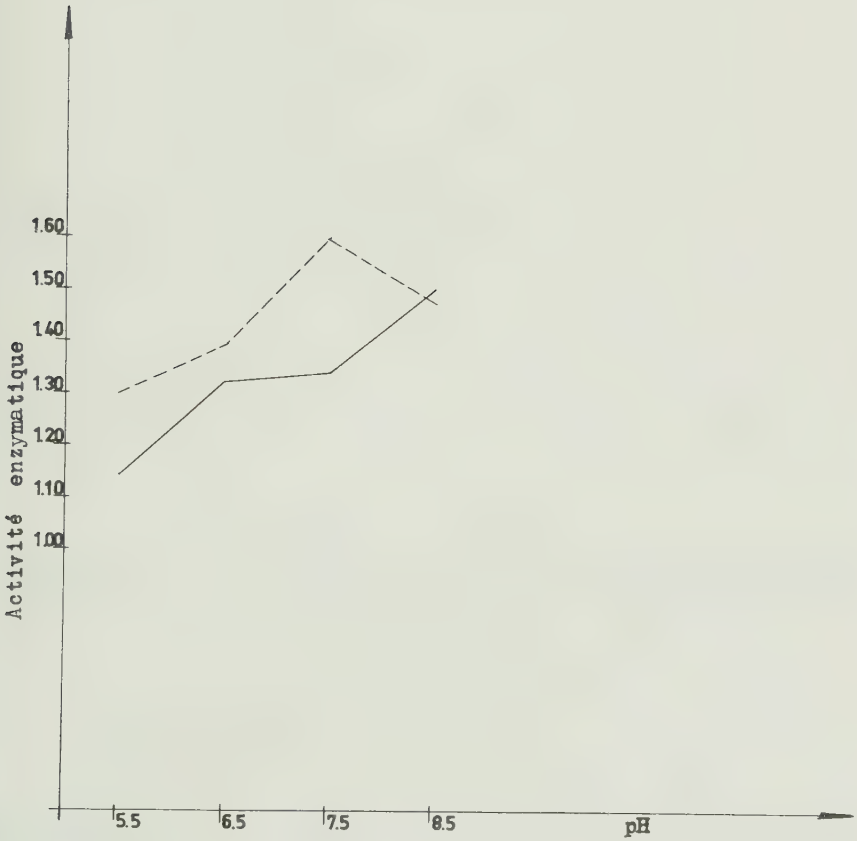


Fig.2.

Influence du pH et de la température sur l'activité enzymatique des Sporocytophaga .
Activité enzymatique = mg.de glucose/ml./5J.
à 28° :A _____ ;à 37° B - - - -
Substrat : Cellulose broyée .

fugation et lavage, et sur ce surnageant concentré sous vide, on dose les sucres réducteurs formés. Les résultats sont exprimés en mg de glucose, par ml.

L'activité croit donc avec l'augmentation du pH, le pH alcalin favorise l'hydratation de la cellulose, qui devient plus réceptive à l'action de l'enzyme.

2 - Variations quantitatives en fonction du pH et de la température (Fig.2)

Nous avons remarqué que les centrifugats de culture portés à 50° perdent une grande partie de leur activité vis à vis de la cellulose insoluble. Nous avons comparé l'activité en fonction du pH et de la température, pour des pH de : 5,5 - 6,5 - 7,5 - 8,5 à 28° et à 37° (durée d'incubation de cinq jours).

La température de 37° augmente l'activité, et cette augmentation est maxima pour le pH de 7,5. A cette même température de 37° et pour le pH de 8,5 une partie de l'activité est altérée,alors qu'au contraire, à 28°, pour ce même pH on note une augmentation très nette de l'activité .

Il faut remarquer que sur l'une et l'autre courbe, cette activité se manifeste par paliers, ce qui laisse supposer la présence, au sein de ce complexe enzymatique brut, de facteurs ayant des spécificités très étroites, en fonction du pH et de la température.

3 - Variations quantitatives en fonction de la durée de réaction, et de la température (Fig. 3)

Nous avons déterminé les sucres réducteurs formés ; les milieux de réaction à pH 7,5, étant placés à 28°, 37°, 45°. Les déterminations ont été faites après une journée d'incubation, et après cinq jours.

La durée de réaction augmente la concentration des sucres réducteurs formés, quelle que soit la température considérée . A 37°, la réaction présente toujours un maximum, aussi bien après un jour qu'après cinq jours d'incubation ; la température de 45° a une action défavorable, et la concentration en sucres réducteurs est nettement plus élevée après cinq jours d'incubation, pour toutes les températures envisagées.

Nous avons répété cette même expérience en faisant varier le pH : tests réalisés en pH 5,5 et 7,5, et nous avons observé un même développement du phénomène, l'activité étant comme nous

l'avons précédemment signalé un peu plus faible en pH 5,5 qu'en pH 7,5, dans les conditions expérimentales utilisées.

4 - Variations quantitatives en fonction de la concentration en substrat (Fig. 4)

Nous avons cherché à déterminer cette concentration en substrat en utilisant pour le test de réaction : 100, 200, 300 et 400 mg de cellulose, en suspension dans 200 ml de milieu de réaction.

On remarque une légère augmentation de la concentration des sucres réducteurs avec l'augmentation de la concentration du substrat.

Cette concentration n'est cependant pas proportionnelle à celle de la concentration du substrat. Le pourcentage de cellulose hydrolysée diminue en effet avec l'élévation de la concentration en substrat.

Conclusions :

De l'étude de ces variations en fonction du pH , de la température, de la durée de réaction, nous pouvons penser que les conditions les plus favorables à cette dégradation de la cellulose insoluble, correspondent à un pH de 7,5, à une température de 37°, et avec une incubation de cinq jours et une concentration de 5 °/₀₀.

Nous avons, pour toute cette partie expérimentale de détermination des conditions optima de dégradation de la cellulose insoluble, utilisé un centrifugat de culture concentrée, le but recherché étant essentiellement de préciser ces conditions optimales de l'action enzymatique des cultures de *Sporocytophaga* , sur la cellulose naturelle.

B - SUBSTRAT SOLUBLE

1 - Variations quantitatives en fonction de la nature du substrat .

L'étude de l'activité enzymatique sur des substrats solubles suppose le choix d'un substrat caractérisé par son degré de polymérisation et son degré de substitution. Nous avons eu la possibilité d'utiliser des Blanoses (celluloses solubles de NOVACEL) offrant des variations du degré de polymérisation et du degré de substitution,

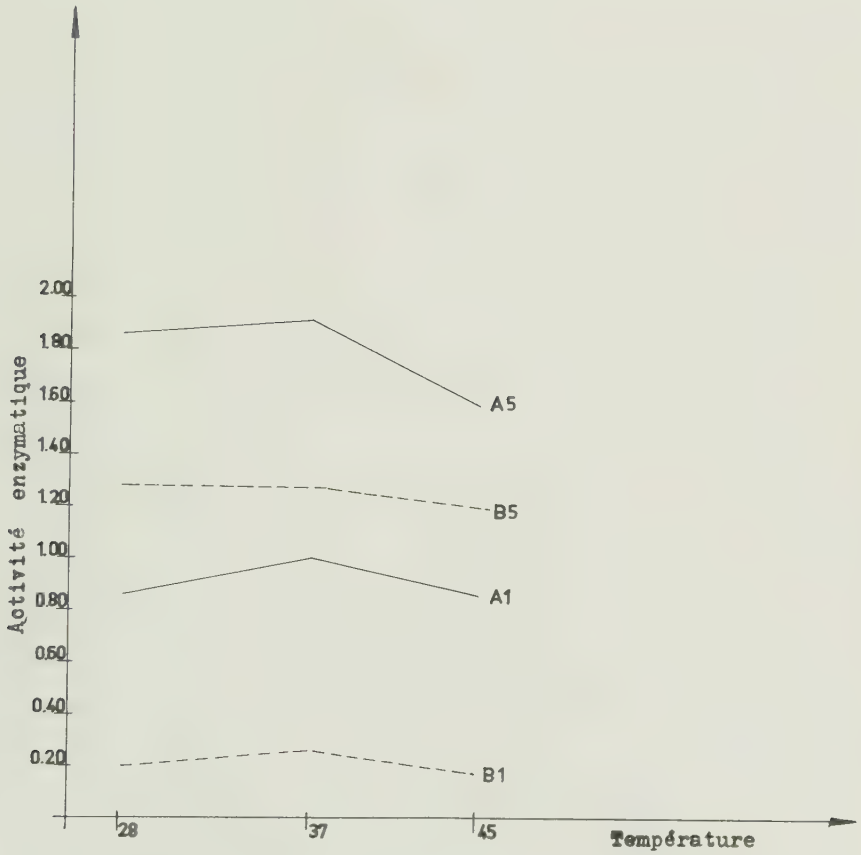


Fig.3.
Influence du pH, de la température, de la durée de réaction, sur l'activité enzymatique des Sporocytophaga . Substrat ; Cellulose broyée .
Activité enzymatique = mg.de glucose/ml.
pH 7,5 ——A1 après 1jour; ——A5 après 5 jours .
pH 5,5 ----B1 après 1jour;---B5 après 5 jours .

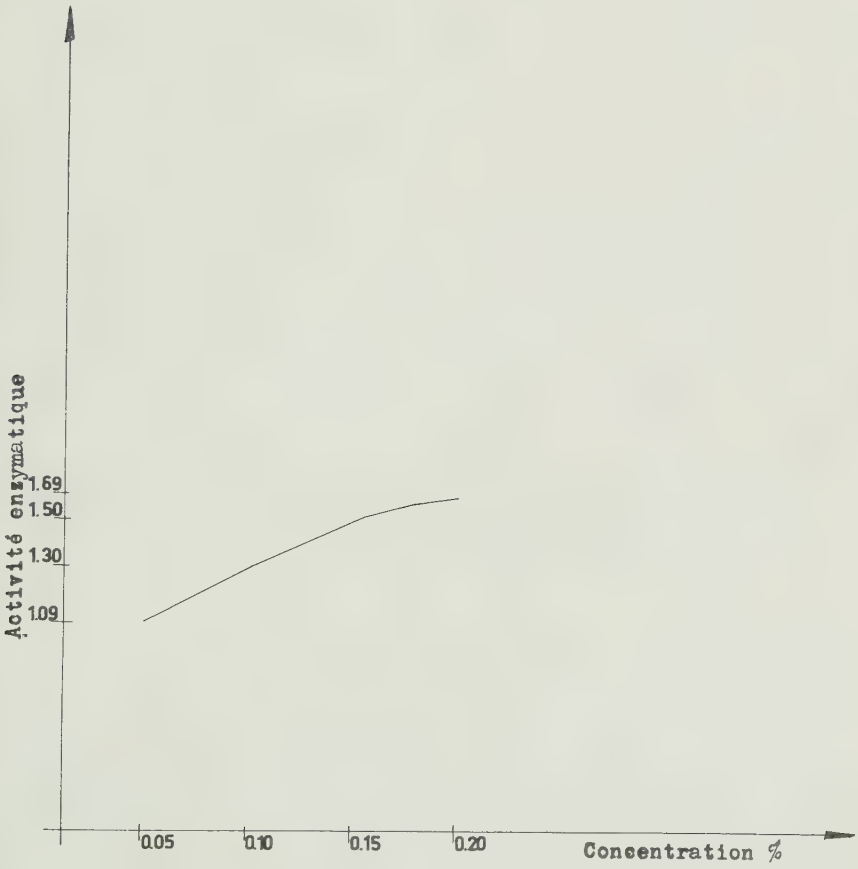


Fig.4.

Influence de la concentration du substrat insoluble, sur l'activité enzymatique des Sporocytophaga . Activité enzymatique = mg.glucose/ml/5j.

et de déterminer les variations des concentrations des sucres réducteurs formés en fonction de la structure du substrat.

a - Variations en fonction du degré de polymérisation (Fig. 5).

Les substrats utilisés : R105, R130, R190, R195 dont le degré de polymérisation exprimé par les deux derniers chiffres va croissant de 05 à 95, sont mis en suspension comme il a été précisé dans le chapitre des techniques, Le test de réaction pratiqué à 28° pendant 20 heures, et les sucres réducteurs formés sont exprimés en mg de glucose, selon la technique précitée.

Il faut remarquer la rapide diminution des sucres formés lorsqu'on utilise successivement le substrat R190 et le substrat R195 ; cette diminution du pouvoir réducteur est en relation étroite avec la nature du substrat : en effet l'échantillon R195 représente l'un des premiers substrats solubilisables ; très hydratable, il a une structure linéaire et donne des solutions colloïdales extrêmement visqueuses. L'échantillon R190 se solubilise beaucoup plus aisément il correspond à une cellulose à structure linéaire, mais dont la longueur des chaînes est diminuée par rapport à celle de l'échantillon R195 ; et cette dépolymérisation rend le substrat beaucoup plus réceptif à l'action de l'enzyme. Les dépolymérisations suivantes augmenteront peu cette réceptivité, ce qui prouve que dès que le substrat est vraiment en phase soluble, il présente un maximum de réceptivité, et alors l'enzyme agit quelle que soit la longueur des chaînes. Ce mécanisme avait été observé par WHITAKER (131) sur les oligosides polymérisés de deux à six fois

b - Variations en fonction du degré de substitution (Fig. 6)

Les échantillons de Blanose R095, R195 et R395, sont des celluloses solubles préparées chimiquement, dont le degré de substitution (voir préparation page 13) augmente de 0,44 - 0,64 - 0,86 (d'après les nomenclatures fournies par NOVACEL) et correspond à une monosubstitution incomplète, et à un degré de polymérisation élevé (95). Les déterminations d'activité réalisées dans les mêmes conditions que précèdemment nous ont permis de constater une très sensible diminution de la réceptivité de l'enzyme, vis à vis de substrats de plus en plus solubilisés, et donc de plus en plus substitués.

Cette solubilisation due à une modification chimique, par réaction de substitution (estérification par le monochloracétate de sodium) sur la chaîne de glucose, provoque donc une inhibition progressive de l'activité enzymatique.

Si donc les substrats solubilisés par des moyens physiques ou chimiques permettent une investigation plus aisée dans la connaissance du mécanisme enzymatique, ils ne doivent être utilisés que dans des conditions très définies. Nous avons retenu pour notre expérimentation le substrat R190, correspondant à la substitution 0,64, et dont le degré de polymérisation encore élevé donne un produit soluble.

2 - Variations quantitatives en fonction du pH (Fig. 7)

Nous avons cherché à déterminer les variations de l'activité enzymatique en fonction du pH, comme nous l'avons fait dans le cas du substrat insoluble. Le milieu est tamponné par le mélange phosphates mono et disodique 0,06 M et on fait une gamme de milieu de réaction de pH 4,5 à pH 8,5. La détermination du pouvoir réducteur est faite après 20 heures d'incubation à 28°.

On note une faible différence dans l'expression du pouvoir réducteur lorsque les conditions de pH varient de 4,5 à 7, mais au-delà de ce pH, l'activité enzymatique diminue progressivement.

Nous avons d'autre part répété cette expérience en faisant les déterminations de pouvoir réducteur après une heure d'incubation à 28°, pour rechercher s'il y avait une spécificité plus étroite des conditions de pH.

L'activité augmente de pH 4,5 à pH 6 où elle présente un palier maximum entre pH 6 et pH 7 , puis elle diminue très sensiblement pour devenir nettement inférieure à celle qui correspond au pH 4,5.

Les enzymes qui agissent spécifiquement sur ce substrat soluble ont donc un optimum d'activité dans une zone de pH de 6 à 7.

3 - Variations quantitatives en fonction de la température (Fig. 8)

Nous avons comparé l'activité de cette culture concentrée à 28°, 37°, 45° en utilisant des milieux tamponnés à pH 5,5 et 7,5.

L'optimum de réaction pour l'un et l'autre des pH considérés se situe à 28°, mais il faut remarquer que les enzymes agissant à pH 5,5 ont une thermostabilité plus importante que ceux agissant à un pH plus élevé. Les enzymes agissant à pH 7,5 sont très sensibles à l'élévation de la température comme nous l'avons également constaté dans le cas d'un substrat insoluble.

Nous pouvons donc penser que les enzymes ayant une activité sensiblement équivalente à pH 5,5 et 7,5, pour une même température de 37°, ont une thermostabilité différente, ce qui laisse

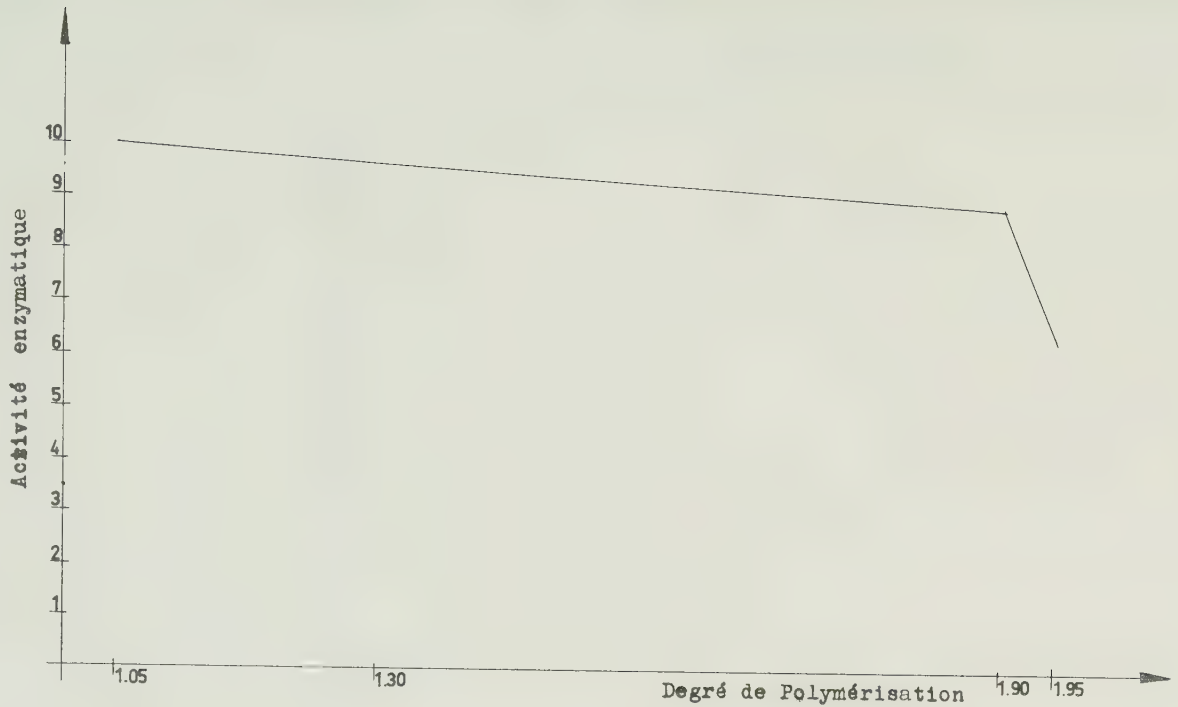


Fig.5.
Influence du degré de polymérisation d'un substrat soluble, type Blanose sur l'activité enzymatique des Sporocytophaga .
Activité enzymatique = mg. de glucose/ml/24 h.

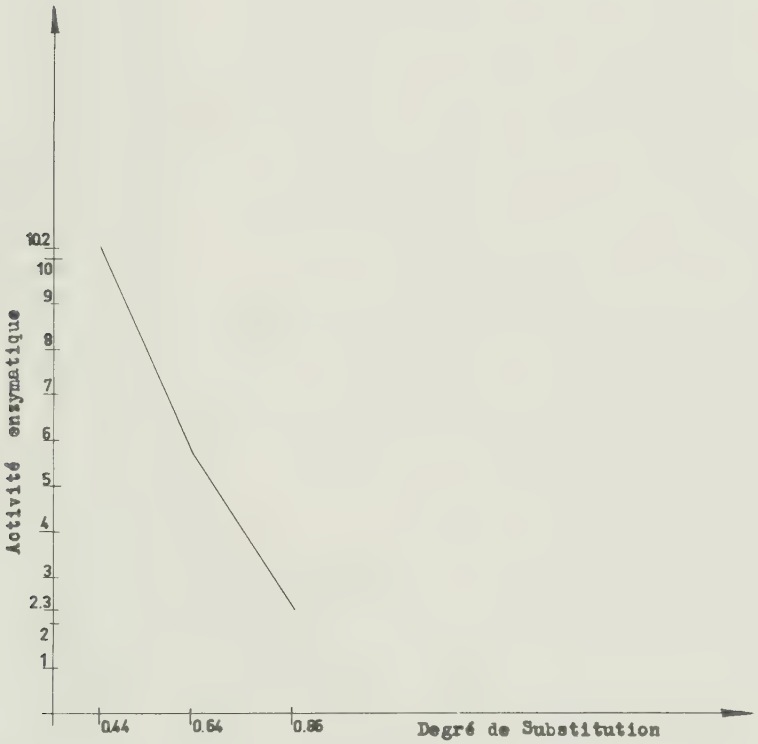


Fig.6.

Influence du degré de substitution d'un substrat soluble, type Blanose, sur l'activité enzymatique des Sporocytophaga . Activité enzymatique = mg.glucose/ml/24h.

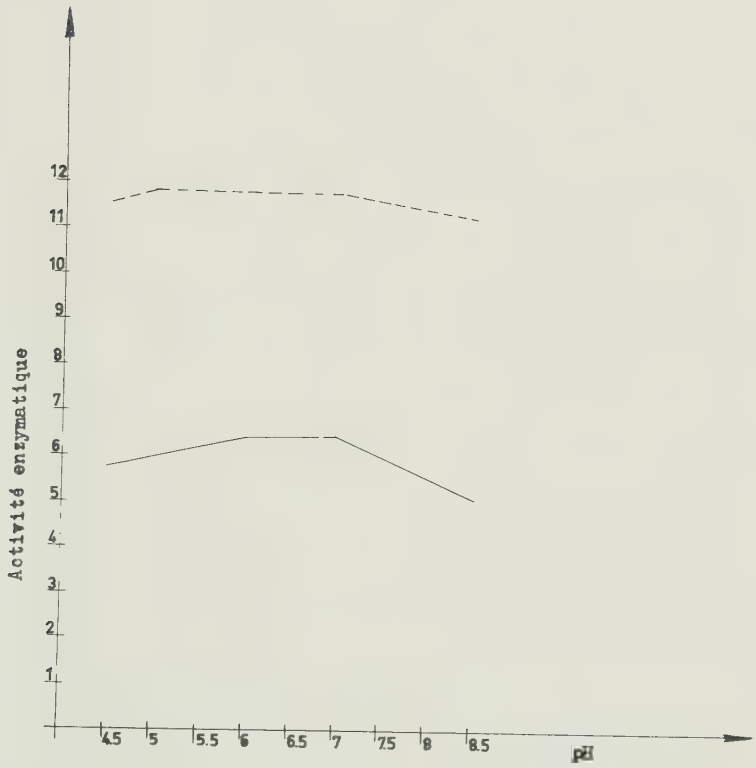


Fig.7.

Influence du pH sur l'activité enzymatique des Sporocytophaga . Substrat soluble : Blanose B 190 .
Activité enzymatique = mg.de glucose/ml/
A ————après 1 heure; B ——après 24 heures.

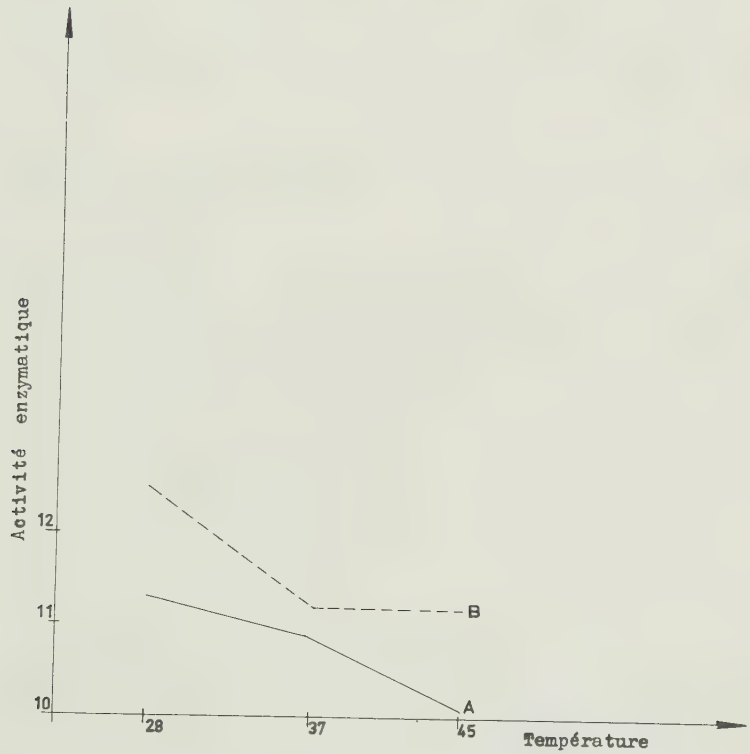


Fig.8.

Influence du pH et de la température sur l'activité enzymatique des Sporocytophaga . Substrat Blanose R190 Activité enzymatique = mg.de glucose/ml/24 heures . en pH 7,5 ——— A ; en pH 5,5 - - - - B .

présumer la présence dans une culture brute de *Sporocytophaga*, d'enzymes ayant des spécificités d'action très définies ; les enzymes agissant sur les chaînes solubles en pH acide étant plus stables que ceux agissant en pH neutre et présentant une activité supérieure sauf à 37°.

4 - Variations quantitatives en fonction de la durée de la réaction (Fig. 9)

Nous avons étudié les variations du pouvoir réducteur en fonction du temps en faisant des prélèvements après 30', 1, 2, 3, 4 et 20 heures, la réaction se déroulant à 37° et à pH 5,5.

Nous avons remarqué que la réaction se développe rapidement et atteint presque son maximum en trois heures. Entre 3 et 20 heures elle forme un palier très légèrement ascendant.

5 - Variations quantitatives en fonction de la concentration en substrat dans le milieu test (Fig. 10).

Utilisant toujours la Blanose R190, nous avons recherché la concentration de la Blanose donnant une réaction maxima. Les concentrations de 4,25 - 5,75 - 7,25 - 8,50 °/₀₀ ont été testées, cette dernière correspondant au maximum de solubilisation de cet échantillon de Blanose (dont le pouvoir réducteur est nul).

On observe donc une augmentation linéaire du pouvoir réducteur avec l'accroissement de la concentration en substrat jusqu'à la limite permise par l'expérimentation.

Conclusions :

L'utilisation des celluloses solubles, préparées par voie chimique ou physique, permet donc de suivre le processus de dégradation par voie enzymatique, à partir de ces substrats à structure linéaire. L'ensemble des facteurs enzymatiques responsables de cette dégradation, désignés par REESE (103) sous le terme de Cx présentent donc certaines caractéristiques qui les distinguent de celles des facteurs enzymatiques responsables de l'activité totale de dégradation, à partir de la cellulose insoluble.

Ces premières investigations sur l'activité enzymatique des *Sporocytophaga* vis à vis de substrats insoluble ou soluble, en fonction des variations de pH, de température, de durée de réaction, et de concentration nous ont permis de constater

- L'hydrolyse beaucoup plus facile d'un substrat soluble, même très polymérisé, que celle de la cellulose insoluble. La quantité de sucres réducteurs formés est d'environ dix fois supérieure et la durée de réaction de quelques heures, alors que pour la cellulose insoluble elle est de plusieurs jours (Fig. 11).

- L'hydrolyse de l'un ou l'autre des substrats révèle des conditions optima de réaction ; pH , température, concentration, durée de réaction différentes ; ce qui laisse penser que ce processus de dégradation serait dû à une multiplicité d'enzymes agissant selon un même mécanisme et possédant des spécificités étroites vis à vis des substrats.

Les enzymes agissant plus spécifiquement sur les substrats insolubles possèdent une activité en pH alcalin : 7,5 et même 8,5, respectivement pour les températures de 37° et de 28°.

Au contraire, les enzymes responsables de l'hydrolyse des substrats solubles, ont une activité plus élevée en pH 5,5 et à 28° ; toutefois il faut noter que la température de 37° révèle une activité sensiblement équivalente, que le pH soit de 7,5 ou de 5,5. Ces enzymes agissant en pH acide seraient plus thermostables (45°) que ceux agissant en pH alcalin.

Il est intéressant de rapprocher ces premières constatations de celles qui ont été faites sur les conditions de culture de ces mêmes germes. En effet les *Sporocytophaga* exigent pour leur développement un pH neutre de 7,2 ou 7,5 , et une température comprise entre 28 et 35°. Ces conditions correspondent donc à celles que nous venons de préciser pour l'hydrolyse d'un substrat insoluble. D'autre part, ces mêmes bactéries poursuivent l'hydrolyse de la cellulose après sa solubilisation par des enzymes agissant plus électivement en pH 5,5 ou 6.

Cet équipement enzymatique des *Sporocytophaga* permet donc d'expliquer la dégradation accomplie par ces microorganismes avec la solubilisation de la cellulose insoluble et sa dégradation en sucres réducteurs et de l'opposer à celle réalisée par les champignons cultivant en pH acide (5) et agissant à ce même pH, sur des substrats solubles, mais ne pouvant lyser totalement la cellulose naturelle.

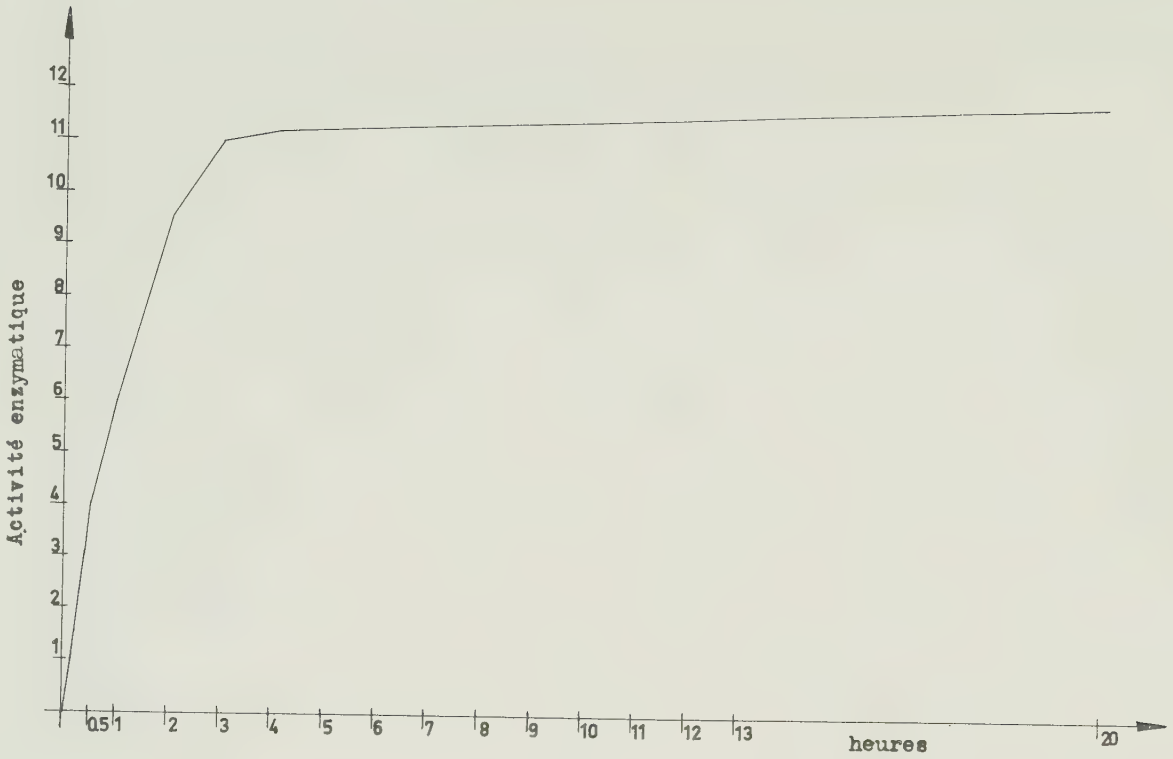


Fig.9.
Influence de la durée de réaction sur l'activité enzymatique desSporocytophaga . Substrat soluble Blanose R 190 .
Activité enzymatique = mg. glucose/ml.

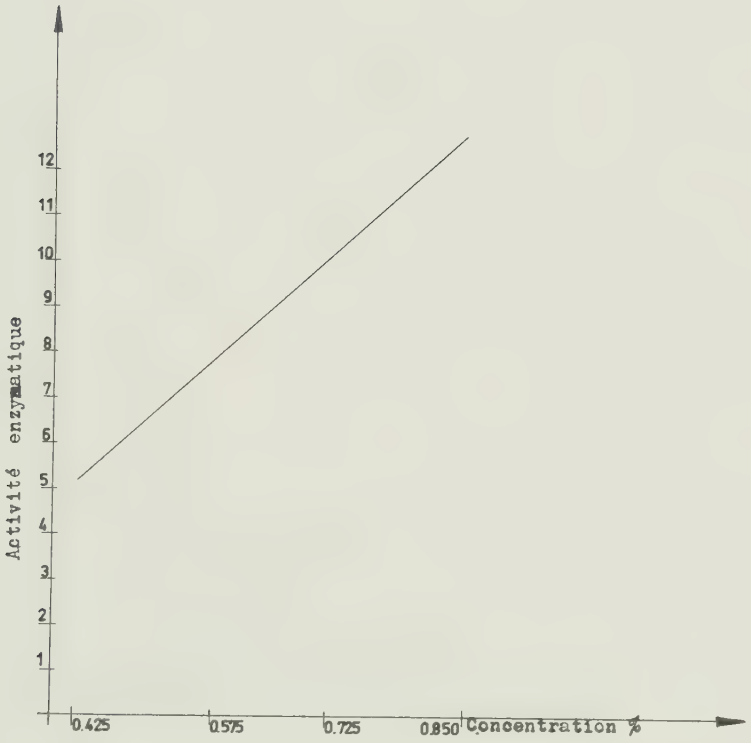


Fig.10.

Influence de la concentration en substrat soluble R190 sur l'activité enzyamtique des Sporocytophaga .
Activité enzymatique = mg. de glucose/ml/24 heures.

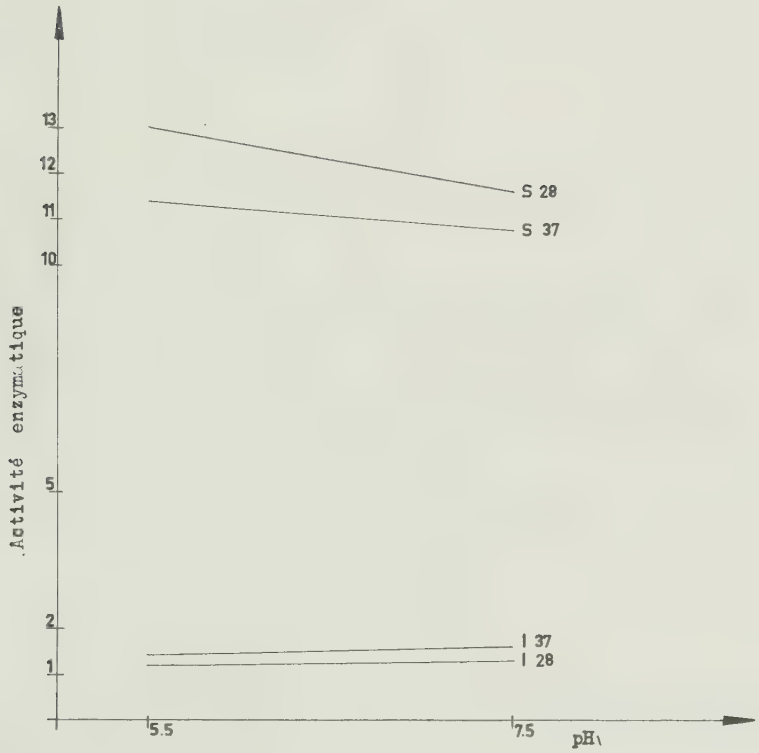


Fig.11.

Activité enzymatique d'une préparation brute sur:
Substrat soluble R190 à 28 et 37° (S28, S37),
Substrat insoluble, à 28 et 37° (I28 , I37) .
Activité enzymatique = mg.de glucose/ml.

II - DETERMINATIONS QUALITATIVES DES PRODUITS DE DEGRADATION

Comme pour l'étude quantitative de la dégradation de la cellulose nous avons d'abord utilisé un produit enzymatique brut le faisant réagir successivement sur la cellulose broyée insoluble, sur la cellulose de HARMSEN (41) partiellement hydrolysée, et sur la Blanose. Les différences obtenues dans ce premier examen nous ont ensuite amené à considérer l'activité de plusieurs fractions enzymatiques, recherchant une spécificité vis à vis de différents substrats considérés, et le mécanisme de dégradation.

A - ETUDE QUALITATIVE DES PRODUITS OBTENUS A PARTIR D'UNE PREPARATION ENZYMATIQUE BRUTE AGISSANT SUR DIFFERENTS SUBSTRATS SOLUBLES ET INSOLUBLES

Nous avons utilisé comme précédemment la cellulose insoluble, la Blanose R190, et la cellulose de HARMSEN, dont la préparation est décrite dans la partie bactériologique concernant la purification des souches. Ce substrat a été retenu puisqu'il est constitué par une cellulose insoluble mais déjà partiellement hydrolysée, permettant un rendement meilleur de la réaction. Les tests sont pratiqués selon le même principe que pour les déterminations quantitatives :

Cellulose broyée ou cellulose de HARMSEN	90 mg
Solution tampon phosphate pH 7, 0,06 M	5 ml
Solution enzymatique (concentrée au 1/2)	10 ml
Eau distillée q.s. pour	25 ml

Incubation de quatre jours à 37°.

Le test sur Blanose est réalisé selon le protocole décrit dans le chapitre des techniques les prélèvements ayant été effectués après 45 , 90, 180 minutes et après 20 heures.

Nous avons dans tous les cas déterminé le pouvoir réducteur total des glucides formés au cours de la dégradation enzymatique, par la méthode de SUMNER et SOMERS, et le glucose par dosage enzymatique à la glucose-oxydase, ce qui nous a permis d'établir un rapport entre le glucose et la totalité des sucres réducteurs ; de plus par chromatographie, nous avons identifié les produits de dégradation.

Il faut noter que pour la chromatographie, les échantillons à étudier, provenant de la dégradation de la cellulose broyée ou de la cellulose de HARMSEN, doivent être désionisés par passage sur colonnes échangeuses Dowex 50 et IR 45, l'éluat étant concentré sous vide ou lyophilisé. Les produits de dégradation de la Blanose nécessitent une précipitation par l'alcool à 90° (volume à volume) qui permet

d'éliminer les grosses molécules, et le surnageant est concentré ou lyophilisé comme précédemment. Pour obtenir une meilleure séparation des sucres sur le chromatogramme, il a été nécessaire dans certains cas, de faire deux ou trois migrations du solvant pendant 20 heures, en séchant le papier entre chaque migration (solvants utilisés 1 et 2).

RESULTATS :

Nous devons examiner les résultats obtenus sur les deux substrats insolubles et sur le substrat soluble Blanose, celui-ci ayant été l'objet de prélèvements après des temps déterminés (Fig. 12 et 13).

1° - SUBSTRATS INSOLUBLES :

	Cellulose broyée	Cellulose de HARMSEN
Glucose/Glucides totaux	33%	66%
Oligosides identifiés par Chromatographie.	Glucose Cellobiose Cellotriose Laminaribiose Gentiobiose 1 Oligoside non identifié, possédant au moins une liaison 1-4.	Glucose Cellotriose 2 Oligosides non identifiés, possèdant au moins une liaison 1-4.

2° SUBSTRAT SOLUBLE : Blanose R190 ; prélèvements après :

	0,75 H	1,5 H	3 H	20 H
Glucose/Glucides totaux (avant précipitation)	8,8 %	8 %	11 %	20 %
Glucose/Glucides totaux (après précipitation)	90 %	50 %	23 %	36 %
Oligosides identifiés par Chromatographie	Glucose	Glucose	Glucose	Glucose
		← Cellotriose →		
		← Oligosides ayant au moins 1 liaison 1-4. →		

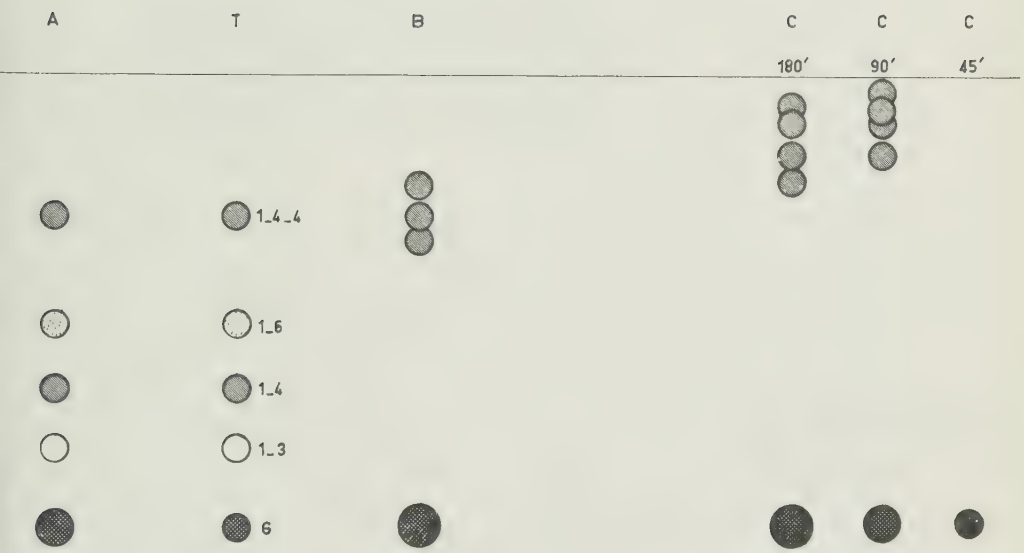
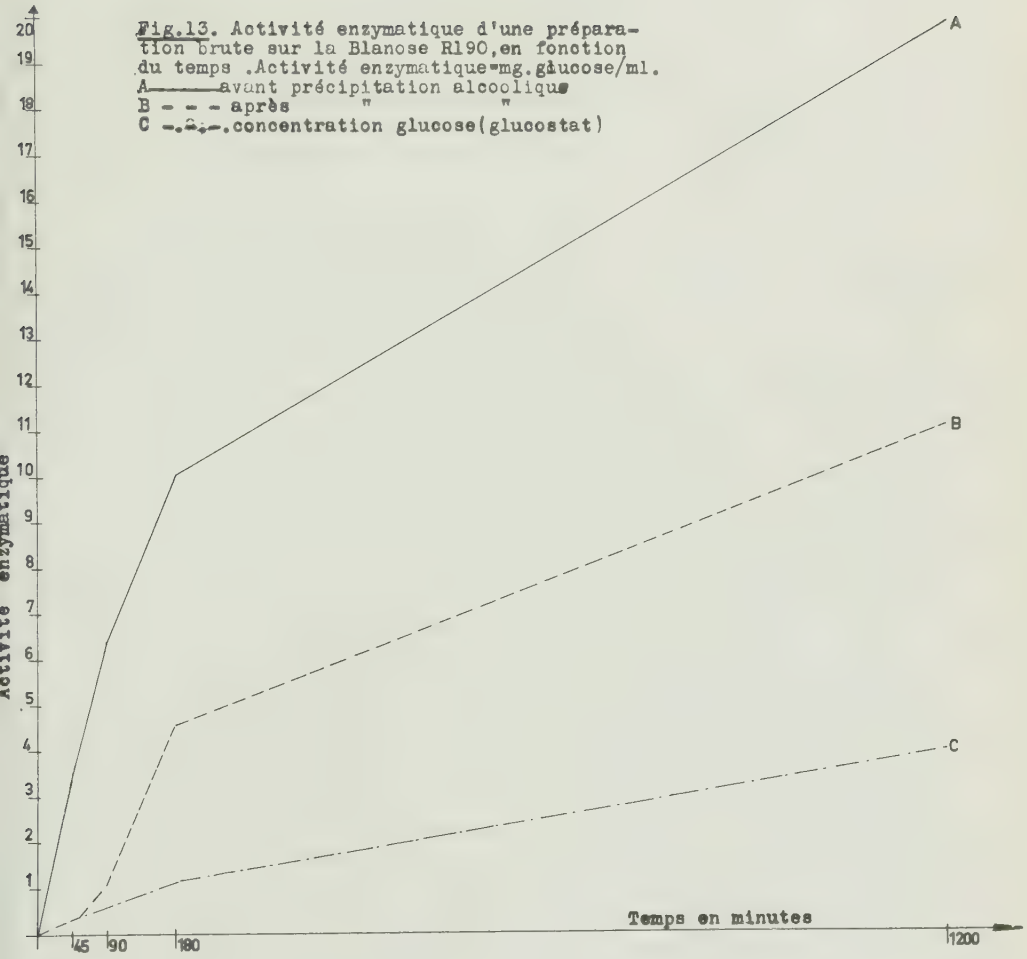


Fig. 12 . Chromatogramme .
Oligosides formés au cours de la dégradation enzymatique, par une préparation brute.
Substrats utilisés: A-Cellulose broyée; B-Cellulose de Harmsen; C-Blanose R190, prélèvements effectués après 45'- 90'- 180' . T= Témoins oligosides : G =glucose, 1-3 laminaribiose, 1-4 cellobiose, 1-6 gentiobiose, 1-4-4 cellotriose .
Solvants : Butanol-Pyridine- Eau :6/4/3. Propanol-Acétaté d'éthyle-Eau:6/1/3 .
Révélateur de SCHWIMMER & BAVENUE .

Fig.13. Activité enzymatique d'une préparation brute sur la Blanose R190,en fonction du temps .Activité enzymatique=mg.glucose/ml.
A———avant précipitation alcoolique
B - - - après " "
C -.-.-.concentration glucose(glucostat)



La lecture de ces résultats nous permet de connaître qualitativement les oligosides qui se forment au cours de la dégradation, par un extrait enzymatique brut total, d'un substrat insoluble, d'un substrat colloïdal mais partiellement hydrolysé, et d'un substrat soluble à longue chaînes. En effet, nous constatons :

1 - La présence de glucose dans tous les échantillons examinés, présence contrôlée par dosage par voie enzymatique et par chromatographie.

2 - La présence du cellobiose, seulement dans le test utilisant comme substrat la cellulose fibreuse insoluble. Dans les deux autres échantillons, le cellobiose n'était pas décelable dans les conditions expérimentales utilisées.

3 - La présence du cellotriose dans tous les échantillons.

4 - La formation d'oligosides, qui avec le réactif de SCHWIMMER (110) ne se colorent pas en bleu, mais en brun-vert, ou en brun gris. Ces oligosides, bi ou triholosides ne possèdent donc pas la liaison 1-4 caractéristique de la molécule homogène de la cellulose, et ne peuvent donc appartenir à la lignée des produits de dégradation de la cellulose. On peut dès lors supposer que le processus de dégradation est accompagné d'un processus de synthèse, à partir des éléments mêmes de la dégradation. Les oligosides non colorés en bleu, mais en brun-vert et en brun-gris, pour les deux bioses dont les R.G. sont de 0,83 et 0,58, les placent de part et d'autre du cellobiose sur les chromatogrammes ; ces deux bioses possèdent en effet les R. G. et les colorations du laminaribiose et du gentiobiose, caractérisés par la liaison 1-3 de deux molécules de glucose, pour le laminaribiose, et par la liaison 1-6 pour le gentiobiose. Les oligosides obtenus avec les substrats Cellulose de HARMSEN et Blanose se colorent tous en bleu, donc possèdent au moins une liaison 1-4 réductrice, mais cependant ces sucres ne peuvent être confondus avec les oligosides à structure 1-4, leur Rf ne permettant en aucun cas de leur appliquer la formule de FRENCH (34), et par là même de prouver qu'ils sont des polymères de 3, 4, 5 ou 6 molécules de glucose liées en 1-4. Leur origine par des mécanismes de transfert sera démontrée dans le chapitre consacré à ces réactions.

Cette analyse qualitative nous permet donc de considérer le glucose comme l'élément le plus simple de la dégradation des hexoses en β 1-4 polymérisés : le glucose est décelable quel que soit le substrat utilisé. La cellobiose, biose à deux molécules de glucose liées en β 1-4, avant dernier maillon de ce long processus, peut être l'objet de synthèses qui se manifestent par la formation d'oligosides à nouvelles liaisons. Le *Sporocytophaga* double donc son activité de dégradation d'une activité de synthèse d'oligosides.

D'autre part, cette étude qualitative a retenu notre attention à un autre égard : celui du mécanisme de la dégradation de la cellulose ; l'étude de la dégradation de la Blanose en fonction du temps nous a permis de suivre les différentes étapes de ce mécanisme sur un substrat soluble mais encore très visqueux, et formé de longues chaînes de glucose.

Par action de l'extrait enzymatique brut, il se produit une rapide diminution de la viscosité et la formation de sucres réducteurs. Nous avons déterminé ce pouvoir réducteur, et la concentration en glucose après 45, 90, 180 minutes et 20 heures de réaction (Fig. 13). On observe une augmentation progressive du pouvoir réducteur total (exprimé en mg de glucose) et de la concentration en glucose (dosé au glucostat), ce qui se traduit pour les trois premiers prélèvements par un rapport Glucose/Glucides totaux de 8, 8 % - 8% - 11%, le rapport après vingt heures d'incubation étant évidemment plus élevé (20 %).

Pour les préparations des échantillons à chromatographier, nous avons fait une précipitation alcoolique (volume à volume) de façon à éliminer les grosses molécules qui ne peuvent migrer sur les chromatogrammes.

Déterminant à nouveau le glucose et le pouvoir réducteur, nous avons remarqué que ces mêmes rapports Glucose/Glucides totaux pour les prélèvements considérés prenaient les valeurs de 90 %; 50 %, 23 % et 36 % (résultats consignés dans le tableau p. 42) Cette variation dans les rapports Glucose/Glucides totaux, le glucose étant évidemment à concentration constante, avant et après précipitation, montre que la diminution de la concentration des glucides totaux est due à la précipitation par l'alcool de grosses molécules réductrices. Ce que l'on peut aussi exprimer en disant que dans le premier temps de la réaction la plus grande partie du pouvoir réducteur est due à la présence de longues chaînes réductrices.

Au fur et à mesure du développement de la réaction, ces longues chaînes font place à des chaînes de plus en plus courtes, d'où la diminution en 180 minutes du rapport Glucose/Glucides totaux de 90 à 23 % . Le dernier prélèvement traduit évidemment une hydrolyse plus complète des chaînes courtes.

Il semble donc dans cette expérimentation sur la dégradation de la Blanose, par une préparation enzymatique brute, que l'on puisse d'une part supposer l'existence de deux grands systèmes enzymatiques: l'un agissant dès le début de la réaction, sur un substrat qui lui est accessible, d'où il libère le glucose, l'autre agissant sur un substrat à longues chaînes, celles-ci étant scindées en chaînons de plus en plus courts. Il ne semble pas que cette libération du glucose se fasse aux dépens du glucose terminal des chaînes seulement, mais que les chaînes soient beaucoup plus coupées par un mécanisme de "hasard".

Une étude plus approfondie de ce processus enzymatique de dégradation est donc nécessaire à envisager afin de déterminer d'une part l'action des différentes fractions enzymatiques en fonction des différents substrats : cellobiose, blanose, cellulose broyée, et d'autre part le mécanisme que l'on peut envisager pour expliquer cette action de dégradation. La formation des produits de synthèse , par le mécanisme de transosylation, sera étudiée dans la seconde partie de ce travail consacrée à ce deuxième aspect de l'activité des ***Sporocytophaga***.

B - ETUDE QUALITATIVE DES PRODUITS OBTENUS A PARTIR DE FRACTIONNEMENTS ENZYMATIQUES.

Utilisant une préparation enzymatique brute et fractionnant celle-ci par des volumes croissants d'acétone (0,5 volume à 1 volume pour un volume de solution enzymatique) nous avons remarqué que les différentes fractions obtenues se comportaient différemment vis-à-vis d'un substrat polymérisé (blanose R. 190) et vis-à-vis du Cellobiose (Fig. 14). Les premières fractions ayant un poids moléculaire plus élevé sont beaucoup plus actives sur le cellobiose que sur la blanose, et les fractions précipitées par un volume d'acétone sont au contraire plus actives sur les chaînes longues. Il semble donc qu'il y ait deux types de fractions à examiner : les unes actives sur les chaînes courtes, les autres sur les polymères solubles.

Nous avons successivement étudié :

- La fraction précipitée par un volume d'acétone, avec les deux substrats précèdemment envisagés (fraction E1)

- La fraction précipitée par 70 % d'acétone, dite fraction "Cellobiase"

- La fraction précipitée par deux volumes d'acétone, après élimination de la fraction cellobiase : fraction "Cellulase".

1 - Etude de la Fraction E1.

Cette fraction est obtenue par précipitation de la solution enzymatique brute par un volume d'acétone. Nous avons comparé son activité sur le cellobiose et sur des blanoses dont le degré de polymérisation croit, et nous avons déterminé le pouvoir réducteur des sucres provenant de cette hydrolyse enzymatique (glucides totaux) et leur concentration en glucose. Les résultats sont groupés dans le tableau, ci-dessous, et sont ramenés à 1 ml. de solution brute, les tests d'hydrolyse ayant été pratiqués selon les techniques précédemment exposées.

	Cellobiose	Blanose R105	Blanose R130	Blanose R190
Pourcentage d'hydrolyse	30%	4,6 %	4%	3,7%
Glucose (mg)		0,96	0,94	1
Glucides totaux		2,80	2,42	2,24
Glucose/Glucides		34%	38%	44%

Cette expérience nous permet de constater =

- La différence entre le pourcentage d'hydrolyse du cellobiose, et celui des substrats polymérisés.

- Parmi ces substrats, blanose, les substrats les moins polymérisés sont les plus hydrolysables . La concentration en glucose est sensiblement la même avec les trois types de blanose, mais les rapports Glucose/Glucides totaux croissent du substrat le moins polymérisé au plus polymérisé, ce qui laisse penser que la coupure des chaînes par l'enzyme se fait au hasard, les chaînes les plus courtes devant alors libérer d'avantage de glucose. Cette fixation de l'enzyme en une quelconque place le long de la chaîne a été qualifiée de fixation au hasard ("Random") et s'oppose à la fixation élective de l'enzyme sur l'extrémité des chaînes pour en détacher le glucose.

2 - Etude de la fraction "CELLOBIASE".

Nous avons obtenu cette fraction par précipitation de la solution enzymatique brute par 0,7 volume d'acétone pour un volume de solution enzymatique brute.

Nous avons étudié successivement son action :

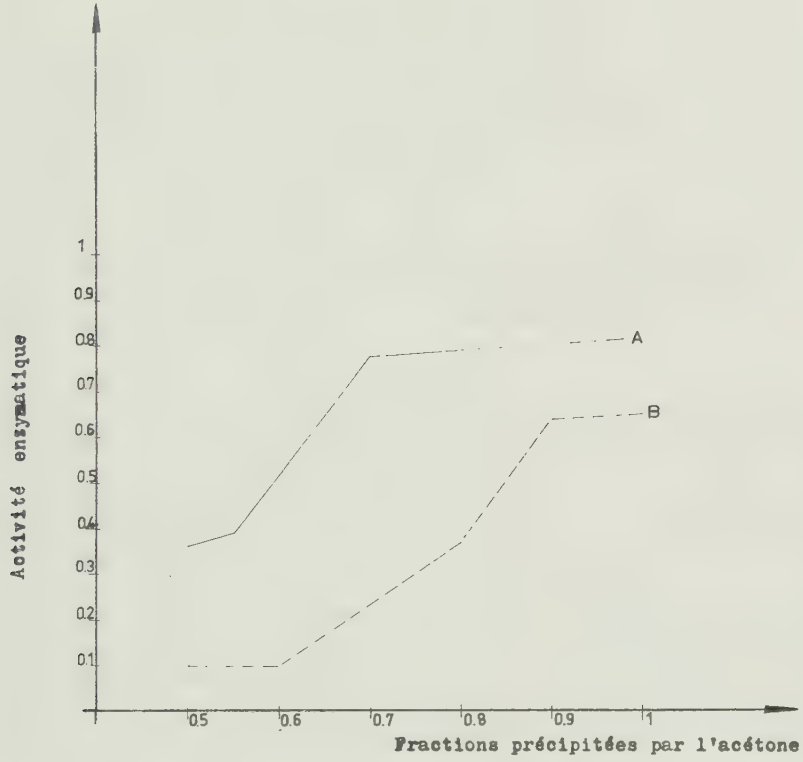


Fig.14.

Activité enzymatique de différentes fractions précipitables par des volumes croissants d'acétone, sur les substrats cellobiose et Blanose R190.
/ctivité enzymatique= mg.Glucose/ml. A ——— cellobiose
B - - - blanose

1 - sur les hétérosides et sur les holosides utilisant comme substrat le salicoside et le cellobiose.

2 - sur les bioses à liaison 1-3, 1-4 et 1-6 (laminaribiose, cellobiose gentiobiose)

3 - sur les polymères à liaison β 1-4 de faible poids moléculaire (cellulose précipitée de HARMSEN).

4 - sur les polymères à liaison β 1-4 de poids moléculaire élevé mais solubles (Blanose R190)

5 - sur la cellulose insoluble.

Nous avons sur ces trois derniers substrats cherché à identifier les oligosides résultant de l'activité de cette fraction par chromatographie.

a - Nous avons constaté que cette fraction agit seulement sur les holosides, confirmant ainsi la distinction faite par certains auteurs entre les cellobiases et les arylglucosidases. Cette distinction d'abord proposée par PIGMANN (93) a été reprise par THOMAS (123), JERMYN (56) et YOUATT (136) dans une étude sur la glucosidase du ***Stachybotrys atra*** . Ces auteurs ont successivement isolé des fractions actives sur les arylglucosides, et sans activité sur le cellobiose et inversement. HASH et KING (43), à partir du ***Myrothecium verrucaria*** ont aussi isolé une fraction active sur le salicoside. KRISHNA MURTI et STONE (62) ont constaté la même distinction en séparant sur colonne, à partir de ***L'Aspergillus niger***, des fractions actives sur le cellobiose nettement distinctes de celles qui sont actives sur le salicoside.

b - Puisque cette fraction enzymatique semble spécifique des substrats holosides, nous avons cherché à déterminer, si elle n'était pas active sur d'autres substrats "Biose" dont les liaisons sont en 1-3 ou en 1-6, et nous avons constaté que cette même fraction d'enzyme active sur le cellobiose, l'était également sur le laminaribiose (1-3). Ces deux sucres en solution à 1 °/$_{oo}$ étant hydrolysés après deux heures d'incubation à 37°, avec un rapport d'hydrolyse de 15 % pour le cellobiose et de 10 % pour le laminaribiose (μ mol. de glucose par minute/concentration en oligoside).

Cette hydrolyse du cellobiose et du laminaribiose par les ***Sporocytophaga*** permettrait d'expliquer l'hydrolyse de la lichenine par ces mêmes microorganismes. En effet ce substrat dont les molécules sont alternativement liées en 1-3 et en 1-4, comme l'ont démontré PEAT, WHELAN et ROBERTS (90) possède donc une structure réceptive à l'action des cellobiases des ***Sporocytophaga***.

C'est aussi ce substrat lichenine qui avait permis à FAHRAEUS (29) de caractériser le glucose dans les produits résultant de son hydrolyse par ces bactéries ; elle avait utilisé une préparation enzymatique brute, et n'avait pas démontré par ailleurs l'action spécifique sur le laminaribiose.

c - Cette même fraction est active sur la blanose R190, sur la cellulose de HARMSEN, et faiblement sur la cellulose broyée ; elle étend donc son action à des substrats insolubles à chaînes courtes, à des substrats solubles à chaînes longues. Cette activité est caractérisée par la libération du glucose quel que soit le substrat utilisé, mais les oligosides accompagnant le glucose différent selon selon chaque substrat. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant et sur la Fig. I5.

Substrats	Oligosides formés
Cellulose de HARMSEN	- Glucose - Cellobiose (traces), cellotriose, cellotétraose. - Oligosides à liaison 1-4 : triholosides dont les R.G. sont voisins de ceux du cellotriose, et possédant au moins une liaison 1-4 réductrice.
Cellulose broyée	- Glucose - Pas de Cellobiose décelable - Oligosides à liaison 1-4 : triholosides dont les R.G. sont voisins de ceux du cellotriose et possédant au moins une liaison 1-4 réductrice.
Blanose R 190	- Glucose - Oligosides : triholosides et tétraholosides possédant au moins une liaison 1-4 réductrice.

Cette activité de la cellobiase étendue du cellobiose aux chaînes plus longues, insolubles ou non, avait été signalée également par YOUATT (136) avec la glucosidase du *Stachybotrys atra* capable d'hydrolyser des substrats solubles polymérisés avec un coefficient d'hydrolyse indépendant du degré de polymérisation. Pour WHITAKER (131) l'étendue de cette activité peut varier avec l'origine de l'enzyme.

D'autre part cette même fraction n'est pas strictement spécifique des liaisons 1-4 puisque nous avons constaté son action sur

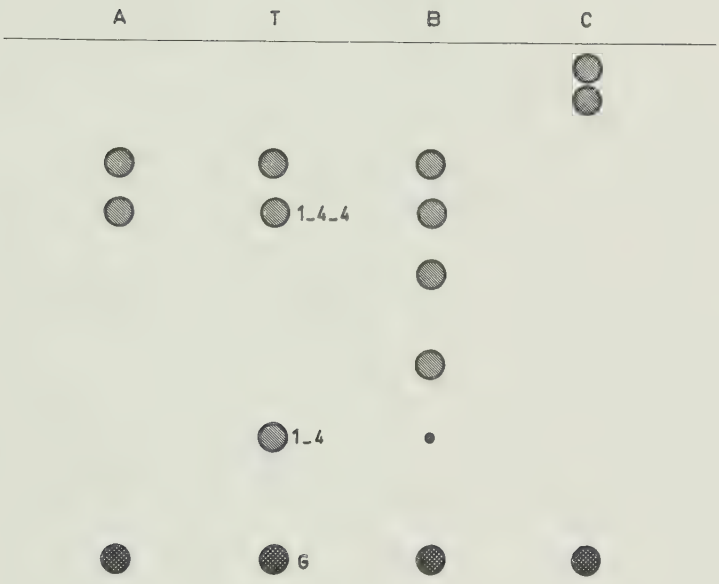


Fig.15. Chromatogramme .
Oligosides résultant de l'activité de la Cellobiase sur les substrats : A-Cellulose Broyée, B- Cellulose Harmsen C-Blanose . Mêmes indications que sur la Fig? 12 .

le laminaribiose, activité à rapprocher de celle utilisée par FAHRAEUS (29) pour ses premiers tests enzymatiques.

3 - Etude de la fraction "CELLULASE"

Cette fraction est obtenue en précipitant le surnageant acétonique après l'isolement de la cellobiase, par de l'acétone de façon à ce que le volume total d'acétone soit égal à deux fois le volume initial de la solution protidique.

a - Activité sur la cellulose insoluble ou soluble.

Après avoir contrôlé l'inactivité de cette fraction sur le cellobiose, nous avons étudié son action sur la cellulose broyée, sur la cellulose de HARMSEN, et sur la blanose R190.

L'étude chromatographique nous a permis de déceler les oligosides formés au cours de cette attaque enzymatique ; les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous et sur la Fig. 16.

Substrats	Oligosides formés
Cellulose de HARMSEN	- Glucose - Traces de dérivés phosphorylés
Cellulose broyée	- Glucose - Dérivés phosphorylés
Blanose R190	- Glucose

Cette fraction d'enzyme est donc capable de libérer le glucose des longues chaînes solubles ou non, mais contrairement à ce que nous avions observé avec la fraction cellobiase, agissant sur les mêmes substrats, il ne se forme pas d'autres oligosides à liaison 1-4 appartenant ou non aux éléments constitutifs de la cellulose. Mais par ailleurs nous avons noté la présence, avec cette fraction cellulase, de dérivés phosphorylés dont l'origine sera étudiée dans la seconde partie de ce travail, avec les mécanismes de synthèse.

b - Etude du mécanisme de la dégradation en fonction du temps.

Nous avons cherché à déterminer la vitesse d'apparition du glucose et des autres oligosides réducteurs provenant de la dégra-

dation de la blanose, par action de cette même fraction d'enzyme. Nous avons utilisé pour cela la blanose R190 et nous avons déterminé le pouvoir réducteur (glucides totaux) et la formation du glucose pendant une incubation de deux heures, en faisant des prélèvements toutes les quinze minutes.

La précipitation par un volume d'alcool, des plus grosses molécules provenant de la dégradation, nous a permis de constater (comme nous l'avions déjà remarqué en étudiant l'action d'une préparation totale) que la dégradation de la blanose devait se faire par coupure des chaînes, donnant lieu à la formation de chaînes courtes, puis de chaînes encore plus courtes, pouvant apparaître sur des chromatogrammes, et ensuite d'éléments plus simples : glucose et cellobiose. Les résultats : détermination du pouvoir réducteur avant et après précipitation par l'alcool, et détermination du glucose sont groupés dans la figure 17.

La dégradation en fonction du temps montre que le pouvoir réducteur qui apparait dès la trentième minute est essentiellement dû à la présence de longues chaînes précipitables par l'alcool, les molécules plus courtes, non précipitables, n'apparaissent qu'à la 75e minute, et le glucose n'est décelé qu'à la 90e minute. L'apparition des chaînes courtes précède donc la formation du glucose, et l'on peut penser que cette fraction enzymatique qui coupe le substrat en éléments de plus en plus courts, coupe au hasard ces chaînes; si l'enzyme agissait spécifiquement sur l'extrémité des chaînes pour en détacher le glucose, celui-ci apparaitrait en premier, ce qui n'est pas le cas.

C - CONCLUSIONS A L'ETUDE QUALITATIVE DE LA DEGRADATION DE LA CELLULOSE.

1 - L'étude qualitative des produits issus de la dégradation des celluloses insolubles ou partiellement solubilisées, par une préparation enzymatique brute ou par des fractions d'enzyme, nous a permis de constater que dans tous les cas il se forme du glucose. Ce glucose est accompagné d'oligosides en quantité d'autant plus élevée que le substrat utilisé est à chaînes plus courtes. Mais parmi les oligosides qui se forment au cours de cette attaque enzymatique, il faut remarquer que certains sont identifiables au cellobiose, et à ses homologues supérieurs, cellotriose et cellotétraose ; on peut donc les considérer comme des éléments provenant de la coupure des longues chaînes de cellulose qui sont elles-mêmes constituées par des molécules de glucose liées en 1-4 comme la molécule de cellobiose, dont ils reproduisent exactement la structure.

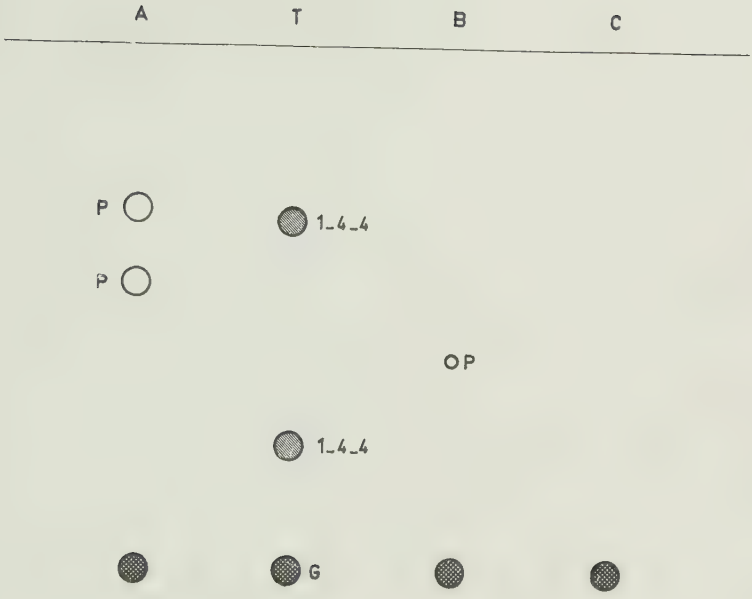
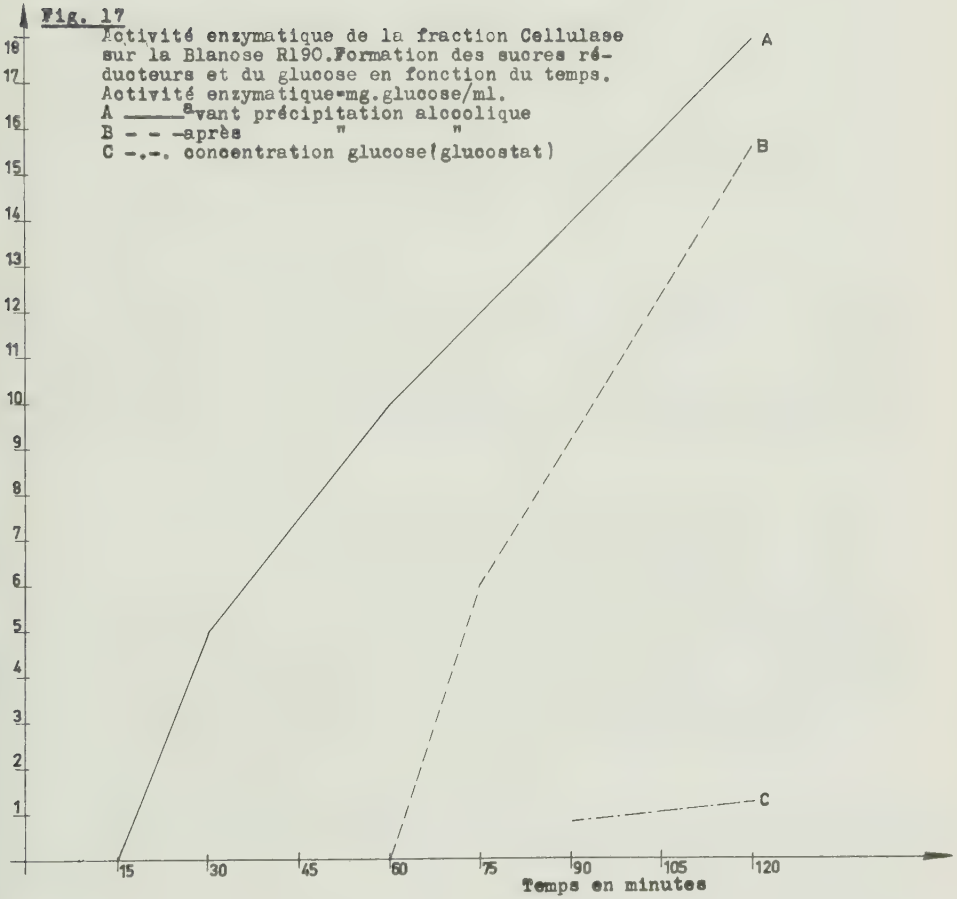


Fig.16;Chromatogramme .
Oligosides résultant de l'activité de la cellulase sur les substrats: A-Cellulose broyée;B- Cellulose Harmsen C-Blanose. Mêmes indications que sur la Fig.12 .
P= Oligoside phosphorylé .

Fig. 17

Activité enzymatique de la fraction Cellulase sur la Blanose R190. Formation des sucres réducteurs et du glucose en fonction du temps.
Activité enzymatique-mg.glucose/ml.
A ——— avant précipitation alcoolique
B - - - après " "
C -.-. concentration glucose (glucostat)



A côté de ces oligosides, nous avons signalé la présence, en particulier dans le cas de la fraction cellobiase sur la cellulose de HARMSEN, d'oligosides ayant le même mode de liaison 1-4 mais ne pouvant être confondus avec le cellobiose et le cellotriose ; ces oligosides ne peuvent donc être considérés comme des produits résultant directement de la dégradation de la cellulose.

De plus, dans le cas d'une préparation enzymatique brute totale, agissant sur la cellulose broyée, nous avons signalé la présence d'oligosides dont les liaisons ne sont pas en 1-4 mais en 1-3 et en 1-6. La présence des oligosides liés en 1-3 et en 1-6, et celle des oligosides (triholosides) possèdant au moins une liaison 1-4, mais n'étant pas identifiables au cellotriose, laisse supposer que le mécanisme de dégradation est accompagné d'un mécanisme de synthèse, qui peut être se produit aux dépens des oligosides formés au cours de la dégradation.

L'activité des *Sporocytophaga* est donc à la fois une activité de dégradation de la molécule complexe de la cellulose jusqu'en son terme le plus simple le glucose, et d'autre part une activité de synthèse à partir de ce même glucose, et cette activité de synthèse, avec la formation de dérivés uroniques, de dérivés phosphorylés et d'oligosides, fait l'objet de la deuxième partie de notre travail.

2 - Hypothèses émises sur le mécanisme de dégradation.

Si la dégradation de la grosse molécule insoluble et ramifiée de la cellulose nécessite un certain nombre de stades intermédiaires jusqu'à la libération du glucose, élément constitutif, on peut supposer que cette dégradation ou hydrolyse est effectuée par toute une série d'enzymes ayant des spécificités propres vis à vis du substrat à dégrader, mais agissant selon un même mécanisme qui aboutit à la libération du glucose.

Ces différentes étapes de solubilisation, de coupure de chaînes, et de libération de glucose correspondent donc à des enzymes spécifiques.

Et , il nous semble particulièrement intéressant de souligner dans ce cas de la dégradation de la cellulose par les *Sporocytophaga* que ce premier temps de l'hydrolyse de la cellulose naturelle fibreuse démontre l'absolue nécessité d'un contact intime entre le substrat et l'enzyme.

Effectivement, la bactérie de par sa morphologie propre, peut s'appliquer étroitement sur la fibre de cellulose dont elle reproduit l'ultra-structure (phénomène d'élasticotaxis) en raison de sa paroi souple et déformable ; d'autre part, sa longueur de 4 µ à 8 µ lui permet aussi de recouvrir la microfibrille de cellulose, cherchant

ainsi le point de rupture de la structure cristalline qui déclenchera sa réaction hydrolysante. Ce contact intime bactérie-substrat, avait été souligné par STANIER (118) et plus anciennement par WINOGRADSKY (134-135), qui supposait même la présence de petites "haustoria" sur la bactérie, qui faciliteraient le premier temps de ce mécanisme.

Nous avons vérifié expérimentalement que la lyse de la cellulose exige ce contact de la bactérie avec le substrat insoluble.

Sur des boîtes de Pétri, contenant une gélose à la cellulose de HARMSEN (gélosée à 8 °/₀₀) on a disposé des carrés de papier DURIEUX stériles, qu'on ensemence avec des cultures de *Sporocytophaga*. Après quinze jours d'incubation à 28°, on remarque que la culture se développe d'abord sur les carrés de papier, puis autour de ceux-ci engendrant une zone claire de lyse ; cette zone lysée contient des bactéries, alors que la zone voisine non encore lysée en est totalement dépourvue. Répètant cette même expérience sur une gélose à 20 °/₀₀, nous avons remarqué qu'il ne se produit pas de lyse autour des carrés de papier, en effet à cette concentration de 20 °/₀₀ la gélose s'oppose à la mobilité des *Sporocytophaga* et donc à leur mise en contact avec le substrat cellulose de HARMSEN. Nous pouvons donc réaffirmer la nécessité de ce mécanisme de contact intime entre la bactérie et le substrat insoluble, et aussi la localisation de l'enzyme ou des enzymes responsables de ce premier temps de lyse, sur les corps bactériens d'où ils ne peuvent diffuser in vivo. L'observation des cultures de *Sporocytophaga* sur un milieu solide montre que ces cultures ne sont pas envahissantes mais restent localisées au lieu même de l'inoculation.

Nous devons rapprocher ces observations de la théorie récemment émise par SELBY (111-112) sur la solubilisation de la cellulose par voie enzymatique.

Ce mécanisme a été beaucoup moins étudié que celui de la dégradation des substrats solubilisés, mais SELBY (111-112) suppose que l'enzyme doit s'appliquer le long de la chaîne de cellulose pour trouver ce point favorable à l'attaque ; cette réaction de contact serait ensuite suivie d'un clivage entrainant la solubilisation des glucides et la formation de chaînes linéaires plus courtes et réductrices.

Cette première attaque, attribuée à un facteur A, serait suivie de la formation d'un produit soluble du type C.M.C. qui entrerait rapidement en compétition avec le substrat initial naturel. Mais cette hypothèse de contact, de rares points d'attaque possible, et de clivage est en relation étroite avec la structure de la cellulose réticulée et n'offrant que de rares points accessibles. Il semblerait

donc que les bactéries ou les longues molécules d'enzyme de faible poids moléculaire auraient le maximum de chances d'atteindre ces points vulnérables et de réaliser ce premier temps de solubilisation du substrat et de sa transformation en chaînes linéaires.

Et ceci nous amène à évoquer la théorie de la multiplicité des enzymes, proposée par de nombreux chercheurs, pour expliquer ces mécanismes successifs, qui après la solubilisation aboutissent à la réduction des chaînes et à la libération des éléments simples.

Les travaux de REESE (103) et de ses collaborateurs, ceux de HASH et KING (43) , ceux de MILLER et BLUM (79), ceux de MILLER et BIRZGALLIS (80) avaient souligné la multiplicité des enzymes qui participeraient à ce mécanisme de dégradation (selon le schéma exposé dans le premier chapitre consacré aux théories générales de la cellulolyse). Ces enzymes Cx responsables de la transformation des chaînes réductrices solubles en oligosides élémentaires avaient été séparés soit sur des colonnes de cellulose, ou de phosphate de calcium, ou d'alumine soit par électrophorèse, et semblaient se distinguer les uns des autres par des teneurs un peu différentes en acides aminés ou en hydrates de carbone. Cette théorie de facteurs multiples s'opposait donc à celle de WHITAKER (130) pour qui toutes ces fractions enzymatiques si elles semblent différer les unes des autres par des teneurs variées en acides aminés ou en hydrates de carbone appartiennent à un seul enzyme qui assurerait toute cette dégradation. L'extraction même de ces enzymes liés aux oligosides du substrat, et les fractionnements et élutions sur les divers supports utilisés peuvent entrainer des altérations de structure et faire croire à l'existence d'une série d'enzymes distincts.

Récemment WHITAKER (133) a isolé sur Séphadex et sur D.E.A.E. cellulose, une fraction qui ne présente qu'un seul pic en électrophorèse et par ultracentrifugation, fraction active sur le C.M.C. qui représente l'enzyme unique et pur responsable de toute cette phase de l'activité. Il faut souligner que cette théorie de l'unicité de l'enzyme pour un substrat déterminé n'exclue pas la possibilité d'existence d'autres fractions actives soit sur les chaînes insolubles, soit sur les chaînes très courtes à deux ou trois molécules de glucose.

Et certains auteurs, reprenant le principe même du mécanisme de la dégradation, STONE (121), PETTERSON (92) (voir les schémas dans la première partie de ce travail) pensent que les enzymes, qui assurent la dégradation de la cellulose insoluble jusqu'au terme du glucose, agissent de façon séquentielle, et qu'il existe une spécificité étroite entre le poids moléculaire du substrat (longueur de la chaîne , degré de polymérisation) et le poids moléculaire de

l'enzyme. C'est ainsi que PETTERSON et PORATH (92) ont isolé à partir du *Polyporus versicolor* par des fractionnement sur Sephadex toute une série d'enzymes dont les poids moléculaires sont compris entre 51.000 et 11.000 et qui seraient spécifiques de substrats dont le degré de polymérisation croit, les enzymes de poids moléculaires les plus bas étant les plus actifs sur les chaînes les plus longues, et au contraire, une glucosidase dont le poids moléculaire est de plus de 55.000 étant active sur les chaînes plus courtes. Il semblerait donc qu'il puisse exister une relation inverse entre le poids moléculaire de l'enzyme et celui du substrat, et que l'enzyme de faible poids moléculaire serait plus actif sur les chaînes les plus longues.

Des séparations précises d'acides aminés sur deux de ces fractions d'enzyme dont les poids moléculaires sont de 51.000 et de 11.000 montrent la présence de seize acides aminés communs dont neuf seraient à des concentrations identiques. Ce qui laisserait penser qu'il existerait des unités communes de polypeptides dans ces deux groupes d'enzymes (GASCOIGNE 35) et que tous ces enzymes agiraient de façon séquentielle sur ces substrats de taille différente, la réceptivité de l'enzyme par le substrat étant en relation avec le poids moléculaire et les dimensions de chacun de ces éléments.

Si cette relation de réceptivité de l'enzyme par le substrat semble très importante dans l'évolution de ce mécanisme de dégradation, il faut aussi mentionner les hypothèses récentes de PERLIN et REESE (91) sur les spécificités des enzymes,cellulases, ou d'une façon plus générale des glucanases.

Comparant l'activité de la cellulase sur la cellulose aux chaînes homogènes liées en 1-4, et sur la lichenine dont les chaînes sont formées de molécules de glucose alternativement liées en 1-4 et en 1-3, on observe que les oligosides qui résultent de l'hydrolyse enzymatique possèdent dans les deux cas une unité de cellobiose réducteur terminal.

Oligosides formés par action de la cellulase (d'après PERLIN)

sur la cellulose : Gl ⟶ 4G

Gl ⟶ 4Gl ⟶ 4G

sur la lichénine : Gl ⟶ 4G

Gl ⟶ 3Gl ⟶ 4G

Gl ⟶ 4Gl ⟶ 3Gl ⟶ 4G

Ce qui fait penser que les cellulases, qui ont une affinité pour le dimère cellobiose, se fixent sur la chaîne homogène de la cellulose là où elles trouvent ce site correspondant au cellobiose, et que la coupure des chaînes se fait à ce niveau, libérant ainsi des unités à 2, 3, 4 molécules de glucose, au hasard de la fixation de l'enzyme le long de la chaîne et selon la longueur de celle-ci. Le cellobiose n'apparaît qu'en très petite quantité puiqu'il possède cette même structure que l'enzyme . L'enzyme peut donc se fixer sur la chaîne quelle qu'en soit la longueur, lorsqu'il rencontre ce site cellobiose. Ce qui explique que les chaînes plus longues soient plus rapidement hydrolysées que les chaînes courtes (WHITAKER 131).

oOo

CONCLUSIONS DE LA PREMIERE PARTIE

1 - Au cours de cette étude de l'activité hydrolysante des *Sporocytophaga* sur des substrats polymérisés, insolubles ou non, formés de molécules de glucose liées en 1-4, nous avons précisé par des déterminations quantitatives les conditions optima d'activité d'une préparation enzymatique brute. La neutralité du pH, la température de 28 à 37° donnant les meilleures conditions pour que s'exerce cette activité. Il est intéressant de souligner le parallèle qui existe entre ces conditions optima d'activité des enzymes et les conditions optima de la croissance de ces germes.

2 - Cette étude du point de vue qualitatif nous a permis de mettre en évidence :

- la formation d'oligosides résultant directement de cette hydrolyse, ou synthétisés à partir de ceux-ci.

- de suivre les étapes de cette dégradation, en soulignant l'importance de la réceptivité de l'enzyme par le substrat et de la multiplicité des enzymes responsables.

a - Recherche des Oligosides.

Au cours de ses premières recherches sur l'activité enzymatique des *Sporocytophaga* FAHRAEUS (29 avait démontré la formation du glucose à partir de la cellophane et de la lichenine. Nous avons essayé de confirmer ces résultats en recherchant le glucose résultant de l'action d'une préparation enzymatique brute et de différentes fractions.

Il s'avère en effet que l'activité soit d'une préparation brute, soit des fractions cellulase ou cellobiase, aboutit toujours à la formation du glucose identifié par méthode enzymatique et par chromatographie.

Puisque le glucose est détaché des longues chaînes par la fraction cellulase, inactive sur le cellobiose, on ne peut lui attribuer une origine par hydrolyse du cellobiose. Toutes les fractions enzymatiques libèrent donc le glucose quelle que soit la longueur des chaînes. Le cellobiose toujours considéré comme élément constitutif de la cellulose ne semble donc pas être un intermédiaire obligatoire ; une même observation avait été faite par FESTENSTEIN (32).

Cette libération du glucose est accompagnée de la formation d'autres oligosides : les uns identifiés comme cellotriose, cellotétraose peuvent être considérés comme émanant directement de l'hydrolyse de la cellulose ; les autres, ne possèdant pas la structure caractéristique de la cellulose avec sa liaison 1-4, ou possédant cette structure et une autre, seraient donc des produits de synthèse élaborés aux dépens du glucose.

Ainsi apparait à côté de l'activité hydrolysante des enzymes une activité de synthèse qui se traduit d'une part , par la formation d'oligosides surtout dus à l'activité de la fraction cellobiase, d'autre part, par la formation de dérivés phosphorylés des sucres, surtout due à l'activité de la fraction cellulase.

b - Mécanisme de dégradation

Le principe même du mécanisme de dégradation de la cellulose par les *Sporocytophaga* du sol a été l'objet de différentes hypothèses, et pour WINOGRADSKY (134) qui le premier a essayé de le définir , il consistait essentiellement en un mécanisme oxydatif. Nous verrons dans la deuxième partie de ce travail quels arguments lui permettaient de soutenir cette hypothèse.

Mais les travaux de STANIER (118) et de FAHRAEUS (29) ont démontré que cette dégradation, comme celle effectuée par les enzymes d'origine fongique, se faisait par un mécanisme d'hydrolyse.

Ce mécanisme suppose donc plusieurs étapes, lorsqu'il s'agit d'un substrat polymérisé, à longues chaînes ramifiées, et insoluble.

La première étape celle de la solubilisation est réalisée par le contact intime de la bactérie vivante avec le substrat ; les enzymes sont donc fixés sur la paroi bactérienne, qui dans le cas de ces germes est particulièrement souple et déformable, ce qui entraine une meilleure adhérence sur le substrat.

La deuxième étape, celle de la transformation des substrats solubles en chaînes courtes réductrices, admet l'intervention de multiples enzymes. Il semble que les enzymes de poids moléculaire

élevé agissent plus spécifiquement sur les chaînes courtes, au contraire, les enzymes de poids moléculaire plus faible seraient retenus par les chaînes plus longues. Il se peut que pour toutes ces fractions d'enzymes, le site soit le même, mais qu'il soit lié à des chaînes plus ou moins longues de glucides ou de peptides.

Cette coupure des chaînes se fait au hasard , la formation des chaînes courtes, qui précède la formation du glucose, le confirme (Fig. 13 et 17), et en aucun cas le glucose n'est détaché préférentiellement de l'extrémité des chaînes.

L'activité enzymatique des ***Sporocytophaga*** au cours de ces premières recherches nous amène à penser que cette activité hydrolysante sur la molécule complexe de la cellulose se traduit par la formation de glucose, ce dernier étant l'objet de nouvelles activités enzymatiques ce qui explique le faible pouvoir réducteur observé par WINOGRADSKY dans les cultures et les difficultés de FAHRAEUS pour mettre en évidence la formation du glucose.

oOo

DEUXIEME PARTIE

ACTIVITE DE SYNTHESE

oOo

REACTIONS DE SYNTHESE A PARTIR DES PRODUITS ISSUS DE LA DEGRADATION ENZYMATIQUE DE LA CELLULOSE

L'étude de la dégradation de la cellulose par des préparations enzymatiques totales ou par des préparations fractionnées nous a permis de déceler la présence du glucose et de différents sucres :

- Oligosides possédant la structure de la cellulose, donc formés de molécules de glucose liées entre elles par la liaison 1-4 cellobiose, cellotriose, cellotétraose.

- Oligosides ne possédant pas cette structure constitutive de la cellulose, mais étant formés de molécules de glucose liées entre elles par des liaisons 1-3 et 1-6.

- Esters phosphorylés des sucres.

Ce bilan souligne donc le fait que l'activité enzymatique des *Sporocytophaga* sur la cellulose ne se limite pas à une simple activité d'hydrolyse, ayant pour terme la formation du glucose, du cellobiose et d'homologues supérieurs, ayant la structure caractéristique de la cellulose, mais cette activité s'accompagne de la formation :

- d'Oligosides dont l'origine ne résulte pas de la coupure de cette molécule homogène de la cellulose,

- d'Esters phosphorylés des sucres.

Ces composés seraient-ils des produits synthétisés à partir du glucose libéré de la molécule insoluble de la cellulose, par hydrolyse enzymatique ? L'activité hydrolysante des β glucosidases peut elle se doubler d'une activité de transosylation, lorsque le glucose atteint une certaine concentration ? Les dérivés phosphorylés doivent ils être considérés comme des produits de synthèse comme les acides uroniques, mettant en évidence une activité de synthèse par voie oxydative ? C'est ce que nous avons essayé d'aborder au cours de la deuxième partie de ce travail.

I - ACIDES URONIQUES ET DERIVES PHOSPHORYLES

A - MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE DE SYNTHESE .

WINOGRADSKY (134) dans sa description des ***Cytophaga*** "fixés à la fibre de la cellulose, et rapidement entourés par une gelée muqueuse" soulignait sans les distinguer les deux grandes fonctions de ces germes capables de décomposer la cellulose insoluble, et de synthétiser des substances muqueuses. La distinction de ces deux fonctions de dégradation et de synthèse, a permis de démontrer que le mécanisme était en réalité un mécanisme d'hydrolyse, et que les produits qui l'accompagnent ne sont que des produits synthétisés par des mécanismes d'oxydation et de transosylation.

1 - DEGRADATION PAR VOIE OXYDATIVE : THEORIE DE WINOGRADSKY.

Pour WINOGRADSKY, la dégradation de la cellulose par les ***Cytophaga*** s'expliquait par un mécanisme d'oxydation dont le mucus ou "Oxycellulose" était l'un des intermédiaires. Il justifiait cette théorie par plusieurs observations :

- Les ***Cytophaga*** sont des microorganismes cellulolytiques au sens strict du terme, c'est à dire incapables de métaboliser le glucose et le cellobiose, et les cultures de ces germes, sur la cellulose ne donnent jamais lieu à la formation de sucres réducteurs dosables par les méthodes utilisées alors. Cette absence de sucres réducteurs, et d'acides organiques qui en dérivent, est un caractère très spécifique des ***Cytophaga*** qui les différencie des autres bactéries cellulolytiques du sol (Cellvibrio, cellulomonas), qui, elles forment des acides organiques fixes et volatils.

- La formation de ce mucus abondant que WINOGRADSKY (134) considérait acide et dénommait "Oxycellulose", était donc

un stade de transformation de la cellulose au cours de son métabolisme par ces microorganismes supportant une semi-aérobiose.

Cette même théorie de la dégradation de la cellulose par voie oxydative a été soutenue un peu plus tard par WALKER et WARREN (126).

2 - DEGRADATION PAR VOIE D'HYDROLYSE ET SYNTHESE PAR VOIE OXYDATIVE .

Les hypothèses avancées par WINOGRADSKY (134) ont été mises en doute dès 1931 par SIMOLA (113) et en 1936 IMSENECKI et SOLNTZEVA (50) suggèrent pour ce mucus une origine de synthèse bactérienne. Par la suite, en 1940 et 1942, NORMANN et ses collaborateurs (86-87) démontrèrent que des bactéries non cellulolytiques pouvaient synthétiser des produits mucilagineux, riches en acides uroniques, comme les polyuronides de la gelée cytophagienne, ce qui ébranlait l'hypothèse de WINOGRADSKY (134) sur le rôle intermédiaire de ces produits dans la décomposition de la cellulose, d'autant plus que ces produits oxydés sont plus résistants à l'attaque bactérienne que la cellulose insoluble elle-même.

Mais la preuve la plus évidente fut donnée par STANIER (118) et par FAHRAEUS (29) qui mirent en évidence, travaillant isolément, que les *Cytophaga* pouvaient métaboliser le glucose dans certaines conditions , et par suite, les *Cytophaga* cultivés dans ces conditions formaient un abondant mucus. Une étude comparative de ce mucus recueilli sur une culture sur cellulose et sur une culture sur glucose, permettait à FAHRAEUS (29) de confirmer des concentrations très voisines en acides uroniques (déterminés par distillation en présence d'acide chlorhydrique à 12 %, et formation de furfurol).

A la suite de ces observations, on pouvait conclure, que la dégradation de la cellulose ne se faisait pas par un mécanisme d'oxydation, mais au contraire par un mécanisme d'hydrolyse, dont le terme final était le glucose. Ce dernier ayant été décelé par FAHRAEUS (29) au cours d'une première investigation sur l'activité enzymatique des *Sporocytophaga* sur la lichenine et sur la cellophane, mais cependant jamais mis en évidence dans les milieux de culture sur cellulose.

D'autre part, la présence d'acides uroniques dans les cultures en milieu glucosé faisait apparaitre une première activité de synthèse de ces microorganismes par voie oxydative. Les deux fonctions de dégradation et de synthèse étaient dès lors mises en évidence.

Nous avons démontré, au cours de la première partie de notre travail, que la dégradation de la cellulose par une préparation enzymatique totale, ou par des préparations fractionnées, avait pour terme, la formation du glucose ; les oligosides et les dérivés phosphorylés qui accompagnent le glucose au cours de cette hydrolyse sont ils comme les acides uroniques, des produits synthétisés à partir du glucose, c'est ce que nous avons essayé de démontrer en comparant les produits formés au cours des cultures sur cellulose et sur glucose, et par l'étude des mécanismes de transosylation enzymatique.

B - EXPERIMENTATION

Comme tout polyoside bactérien, ce mucopolyoside est formé d'une protéine et d'un groupement polyosidique ou prosthétique. Ce mucopolyoside bactérien étudié par WALKER et WARREN (126) et par FAHRAEUS (29) se solubilise en pH alcalin (8, 8) et plus facilement à chaud (60°), et flocule en milieu acide (pH 3, 5) en formant un gel mucilagineux coloré en jaune d'oeuf, pigmentation caractéristique des *Sporocytophaga* du sol.

Reprenant l'étude de ce mucopolyoside nous avons précisé : la présence des acides uroniques, mis en évidence des dérivés phosphorylés, des acides nucléiques et des oligosides.

Les cultures utilisées pour ces différentes recherches proviennent de culture sur coton cardé (selon la technique précèdemment décrite) débarrassée des résidus de cellulose non attaquée, et des corps bactériens par une ultracentrifugation de 10' à 30.000 G. Les culots bactériens ainsi isolés sont remis en suspension dans une solution de tampon borate pH 8, 5 à 50°, agités pendant 30' et recentrifugés comme précèdemment. Les surnageants obtenus sont concentrés par lyophilisation.

1 - TECHNIQUES UTILISEES .

a - Les caractérisations chimiques sont les suivantes :

1 - Détermination du POUVOIR REDUCTEUR et de la concentration en GLUCOSE, selon les techniques précèdemment exposées.

2 - Recherche des ACIDES URONIQUES, par la méthode de DEICHMANN (23).

Cette méthode apporte une modification à la réaction de TOLLENS des acides uroniqués en présence de naphtorésorcinol.

Les acides uroniques préalablement libérés par une hydrolyse chlorhydrique (45' à 70°) sont mis en contact avec la solution de naphtorésorcinol concentrée (10 %) et à la température de 50° pendant 90 minutes(ce qui évite les interférences dûes aux pentoses). La coloration qui se développe permet une lecture au spectrophotomètre à 570 m μ et est particulièrement sensible pour des concentrations en acides uroniques comprises entre 40 et 200 γ

Utiliser une solution limpide de naphtorésorcinol à 10 % dans l'alcool à 95 ° (stable huit jours à 4°).
Hydrolyse préalable : 5 ml de solution à doser contenant 40 à 200 γ d'acides uroniques sont mélangés à 0,2 ml de HCl à 19 %, dans une fiole de 50 ml (bouchage émeri) et maintenus 45' à 70 °.

Réaction colorée : ajouter ensuite 5 ml d'acide chlorhydrique concentré et 1 ml de solution de naphtorésorcinol à 10 % et porter au bain-marie à 50° pendant 90' . Après refroidissement on extrait la coloration bleue-violacée par 15 ml d'éther, et on fait la lecture au spectrophotomètre à 570 m μ

3 - Recherche et dosage du PHOSPHORE MINERAL par la méthode de DELSAL et MANHOURI (24).

On transforme l'acide phosphorique en acide phosphomolybdique que l'on réduit par le mélange Rhodol-sulfite, et on dose colorimétriquement la teinte bleue développée.

Cette méthode découle de la méthode de FISKE et SUBBAROW (33) mais est trois fois plus sensible,et permet le dosage du phosphore inorganique (1,2 à 2 γ de P/ml), après déprotéinisation par l'acide perchlorique ou trichloracétique. Elle demande la préparation des réactifs suivants :

Réactifs :

- Tampon acétate de sodium-acétate de cuivre (pH 4)
  80 ml. Acide acétique 2N + 4,5 g acétate de sodium, 3 H20 + 0,25 g de Cu SO4, 5 H20 ; compléter à 100 ml avec la solution d'acide acétique 2 N.
- Solution de Rhodol-Sulfite (extemporanée)
  2 g de Rhodol dissouts dans 80 ml d'eau distillée, ajouter 10 g de sulfite de sodium 7 H20, et compléter à 100 ml avec de l'eau distillée. Utiliser 1 ml de ce réactif pour un volume total de 10 ml.

Technique :

Dans une fiole jaugée de 10 ml on ajoute successivement et en mélangeant bien après chaque réactif :

1 ml d'extrait perchlorique contenant le phosphore à doser
5 ml tampon acétique-cuivre
1 ml molybdate d'ammonium à 5 %
1 ml Rhodol-sulfite, et compléter à 10 ml avec H_2O.

La lecture se fait à 880 mμ immédiatement si la déprotéinisation a été faite avec l'acide perchlorique, ou après quatre minutes si on a utilisé l'acide trichloracétique. (faire des témoins avec 1 ml d'acide trichloracétique à 5 % ou 1 ml d'acide perchlorique à 2 %).

4 - Recherche des LACTONES par la méthode de BRODIE et LIPMANN (11) dont le principe est le suivant : les lactones et les esters réagissent avec l'hydroxylamine en milieu alcalin, tandis que les acides résultant ne réagissent pas avec ce même réactif. Les acides hydroxamiques formés donnent avec le perchlorure de fer un complexe coloré qui peut être mesuré à 550 mμ.

Réactifs :

- Solution d'hydroxylamine 2 M (13, 9 %)
- Solution de soude 3, 5 N
- Acide chlorhydrique dilué au tiers
- Solution de perchlorure de fer 0, 37 M ($FeCl_3$, 6 H_2O)
- Solution précèdente diluée au 1/5.

Technique : mélanger

1 ml de l'échantillon à doser
1 ml de solution de chlorhydrate d'hydroxylamine
1 ml de solution de soude
1 ml d'acide chlorhydrique dilué
1 ml de solution concentrée de perchlorure de fer.

Faire un témoin avec la solution de perchlorure de fer diluée, et lire au spectrophotomètre à 550 mμ

5 - Détermination des ACIDES NUCLEIQUES, par caractérisation du RIBOSE et du DESOXYRIBOSE.

- L'extraction des acides nucléiques a été faite selon la méthode de SCHNEIDER (109), séparation de la fraction acido-soluble par l'acide trichloracétique à 10 %. Le culot obtenu

est relavé par la solution trichloracétique et délipidé par lavage à l'éther-alcool, et déprotéinisé par l'acide trichloracétique à chaud (le culot est repris par 1 ml d'eau et additionné de 1 ml d' acide trichloracétique à 10 % chauffage de 15' à 90°).

Les acides nucléiques restent en solution et cette solution est utilisée pour la caractérisation des pentoses.

- Caractérisation des Pentoses : Ribose et Désoxyribose.

RIBOSE : Nous avons utilisé la réaction à l'orcinol de MEJBAUM (75) modifiée par MOULE (83) (chlorure cuivrique catalyseur).

Réactifs : solution d'Orcinol : 5 mg d'Orcinol Merck par ml d'acide chlorhydrique concentré contenant 7 mg°/oo de chlorure cuivrique (Cu C12, 2 H2O).

Technique : Dans un tube de 30 ml (bouchage émeri) on porte 2 ml de solution phosphoribonucléique à doser et 2 ml de réactif et on maintient au bain-marie 20' à 100°. Lire au spectrophotomètre à 665 mμ . Faire un témoin avec 2 ml. du solvant de l'ARN.

DESOXYRIBOSE : Nous avons utilisé la réaction à la Diphénylamine de DISCHE (25) modifiée par BURTON (13) (Acétaldéhyde).

Réactifs : 1,5 g de Diphénylamine MERCK
100 ml d'acide acétique + 1,5 ml de H2 SO4

Au moment de l'emploi ajouter 0,25 ml de solution aqueuse d'acétaldéhyde (16 mg/ml) à 50 ml de solution de diphénylamine.

Technique : dans un tube de 10 ml , ajouter successivement :

1 vol. de solution d'ADN (contenant 1 à 10 γ P)
2 vol. de réactif à la diphénylamine
Chauffer au bain-marie 15' à 70° et lire la densité optique à 600 mμ .

b - Par CHROMATOGRAPHIE, nous avons recherché par la méthode descendante sur papier ARCHES 310 : les oligosides, les acides uroniques, le phosphore minéral et organique, les Lactones des sucres et les Acylphosphates.

Nous avons utilisé pour ces recherches la phase acido -soluble après précipitation des acides nucléiques.

Les Acylphosphates ont été extraits par la méthode de STADTMAN et BARKER (116) :

0,5 ml de solution à étudier sont mis en contact avec un volume égal de réactif à l'hydroxylamine (solution à 28 %) ; après 10' , ajouter 25 ml d'éthanol, et centrifuger ; évaporer à sec le surnageant et le reprendre par 2 ml d'éthanol absolu.

1 - Solvants : nous avons utilisé :

n° 1 : Propanol-pyridine-acide acétique-eau : 8-8-1-4
n° 2 : Acétate d'éthyle-acide acétique-eau : 9-2-2
n° 3 : Ethanol-eau-acide acétique : 85-10-5
n° 4 : Butanol saturé d'eau.

Les solvants 1 et 2 séparent bien les oligosides et les acides uroniques. Le solvant 3 (OERTEL 88) a été utilisé pour les acides uroniques et les lactones des sucres acides, et le solvant 4 pour les Acylphosphates.

2 - Révélateurs : nous avons utilisé comme précédemment :

1 - le réactif de PETEK (21) : β napthylamine - thymol
2 - le réactif de SCHWIMMER (110) : aniline-diphénylamine phosphorique.
3 - le réactif de BURROWS (12) : molybdate - acide perchlorique .

Ces trois révélateurs ont été précédemment décrits.

4 - Le réactif de ROBINSON et SMITH (107) au naphtorésorcinol pour la révélation des lactones, des lactones des sucres acides et des glucuronides : dissoudre 0,10g de naphtorésorcinol dans 100 ml de butanol contenant 20 g d'acide trichloracétique. Chauffage de 15' à 110°.

5 - Le réactif de STADTMAN et BARKER (116) au perchlorure de fer : dissoudre 50 g de Fe Cl3 , 6 H2O dans un litre d'alcool à 95° contenant 0,1 N d'acide chlorhydrique. Les acylphosphates se révèlent à froid en donnant une coloration rouge, avec une sensibilité de 0,01 à 0,02 μ M.

2 - RESULTATS .

La recherche comparative des acides uroniques et des dérivés phosphorylés présents dans les cultures en milieu glucosé et en milieu à la cellulose, nous ont permis de confirmer les données de FAHRAEUS (29) concernant les acides uroniques, et de déceler en outre dans les

deux types de cultures soumis à l'analyse la présence de dérivés phosphorylés.

Les cultures faites avec l'un ou l'autre des substrats ne sont pas réductrices, et ce pouvoir réducteur n'apparait qu'après déprotéinisation par l'acide trichloracétique à 5 %. Nous avons cherché à caractériser les acides uroniques et les composés phosphorylés par des méthodes chimiques et par chromatographie.

a - ACIDES URONIQUES

Il faut remarquer que la méthode utilisée par FAHRAEUS (29) ne permettait pas d'identifier spécifiquement les acides uroniques puisque d'autres composés pouvaient interférer, et une réserve avait été émise par l'auteur même, sur la valeur absolue de ses résultats.

1 - nous avons pu mettre en évidence les acides uroniques libres sous forme de lactone, dans le milieu de culture sur cellulose ou sur glucose, aussitôt après la phase exponentielle ; les solvants utilisés étaient les solvants 2 et 3, et les révélateurs 1 et 2.

Cette constatation affirme donc bien l'origine synthétique de ce produit d'oxydation.

2 - les cultures plus âgées (10 jours pour la culture sur cellulose) sont intensément pigmentées en jaune, et les acides uroniques sont libérés après hydrolyse acide (HCl 2N, 100°, une heure), et donnent à 50° avec le naphtorésorcinol, selon la technique de DEICHMANN (23) une réaction positive. Il semble bien que ces acides uroniques soient liés au pigment flavonique élaboré par les *Sporocytophaga*.

3 - les cultures déprotéinisées par l'acide trichloracétique à 5 % contiennent dans la phase acidosoluble des acides uroniques sous forme d'esters. L'hydrolyse de 7' en milieu acide N, à 100° libère du phosphore et des acides uroniques.

Nous avons ainsi pu confirmer et préciser les données de FAHRAEUS (29) : les acides uroniques sont bien des produits de synthèse ils apparaissent après la phase exponentielle, et peuvent être estérifiés sur le carbone 1 ou être combinés au pigment flavonique.

b - DERIVES PHOSPHORYLES

Etudiant parallèlement l'origine synthétique des dérivés uroniques et phosphorylés, nous avons recherché la présence de ces composés dans les cultures faites en milieu glucosé et en milieu cellulose.

La présence de ces composés contenant du phosphore organique a été mise en évidence précèdemment : l'hydrolyse en milieu acide N, de 7' à 100°, confirme la phosphorylation du carbone 1 ; ces esters étant beaucoup plus labiles que ceux du carbone 6, et la quantité de phosphore libéré est sensiblement la même, en culture sur glucose ou sur cellulose -(150 γ par ml. de culture).

Cette libération du phosphore est accompagnée d'une augmentation du pouvoir réducteur ; mais la quantité de phosphore libéré est toujours plus élevée que celle qui correspond à l'estérification des sucres réducteurs.

Nous avons recherché la nature des produits estérifiés dans les deux types de culture, et nous avons mis en évidence par chromatographie, utilisant les solvants 2 et 3, et les révélateurs 3 et 5, que la phosphorylation portait à la fois sur des composés cétoniques, sur des acides uroniques, et sur des lactones des sucres acides.

La recherche des esters d'acides organiques (acylphosphates) dans les deux types de culture, a donné des réactions positives (par la méthode de BRODIE et LIPMANN 11). La recherche de ces mêmes composés par chromatographie selon la technique de STADTMANN et BARKER (116) nous a permis de constater la présence de deux mêmes taches sur les chromatogrammes, dans les deux types de cultures examinés, taches dont les Rf sont de 0,20 et de 0,63 ; d'après les références de ces mêmes auteurs, le Rf de 0,63, correspond à la migration du Propionylphosphate (Rf des dérivés hydroxamiques des acylphosphates, d'après STADMANN à BARKER : Acétyl, Propionyl, Butyryl, Valèryl, caproylphosphate = 0,52 ; 0,65 ; 0,76 ; 0,81; 0,86).

La présence de dérivés phosphorylés thermolabiles, dans les deux types de culture, nous permet de confirmer, comme pour les acides uroniques, la formation de ces composés par un mécanisme de synthèse.

c - SUBSTANCES NUCLEIQUES

Nous avons complété l'étude de ce mucopolyoside bactérien en recherchant les acides nucléiques. Ceux-ci ont été extraits par la méthode de SCHNEIDER (109) et caractérisés par la présence du ribose et du désoxyribose.

Dans les deux types de culture, nous avons décelé la présence de ces deux types d'acides nucléiques à des concentrations sensiblement équivalentes : 10 ɣ d'ADN et 12 ɣ d'ARN par ml de culture. La recherche de ces sucres a également été positive dans le surnageant acido-soluble d'extraction : 50 ɣ d'ADN et 25 ɣ d'ARN par ml de culture.

La morphologie des *Sporocytophaga*, le cycle évolutif, avec la formation du microcyste précèdée de deux réductions nucléaires et d'une lyse cytoplasmique, permet d'expliquer la présence des acides nucléiques. Ceux-ci, par ailleurs, ont été mis en évidence dans d'autres polyosides bactériens ; CARSON (15) les a décelés dans le mucopolyoside d'un *Pseudomonas aeruginosa* contenant des mannanes.

d - OLIGOSIDES

L'étude des oligosides est plus spécialement traitée dans le chapitre suivant concernant les réactions de transfert, mais nous devons signaler néanmoins la présence du glucose dans les cultures faites sur cellulose, à très faible concentration : 10 ɣ par ml de culture, et la présence de pentoses.

3 - CONCLUSIONS .

L'étude comparative des métabolites de culture des *Sporocytophaga*, sur milieu glucosé ou contenant de la cellulose, et en particulier l'étude des acides uroniques et des dérivés phosphorylés, met en évidence l'activité de synthèse de ces microorganismes à partir du glucose. FAHRAEUS (29) avait démontré que les acides uroniques ne devaient pas être considérés comme des produits intermédiaires dans la dégradation de la cellulose, mais au contraire comme des produits de synthèse, et nous pouvons penser qu'il en est de même pour les dérivés phosphorylés qui se rattachent à cette même activité de synthèse.

Il est intéressant de souligner dans ce mécanisme de synthèse, le rôle important joué par les mécanismes d'oxydation, comme en témoigne la formation des acides uroniques, des lactones des sucres acides, des esters phosphorylés des sucres. Tous ces métabolites traduisent un intense processus oxydatif, qui avait entrainé WINOGRADSKY (134) à considérer ce seul processus comme responsable de la dégradation de la cellulose.

En effet, l'oxydation du Carbone 1 conduit à la formation d'un acide aldonique : l'acide gluconique, et celle du carbone 6, à la formation d'acide uronique, ces deux acides, acide-alcool et acide aldéhyde, correspondent à une oxydation ménagée enzymatique,

fréquemment observée dans les milieux biologiques. Il faut remarquer que l'acide uronique apparait dans les cultures aussitôt après la phase exponentielle et ensuite se combine au pigment flavonique dont on peut le libérer par hydrolyse acide.

La formation de ce mucus pigmenté s'observe aisément dans les cultures en milieu liquide, toujours stationnaires, où il forme un voile épais qui se développe immédiatement sous le ménisque liquide, confirmant ainsi le processus d'oxydation en semi-aérobiose.

Les travaux de LIPMANN (66), de COHEN (17), de CORI et LIPMANN (19) et de HORECKER et SMYRNIOTIS (46) ont contribué à démontrer la transformation des hexoses en pentoses, par un processus d'oxydation du glucose ou du glucose-6-phosphate, en acide gluconique ou en 6-phosphogluconate ; le stade intermédiaire de la transformation de la fonction aldéhyde correspondant à une perte de 2 H, est la lactone :

$$\text{Glucose} \xrightarrow[-\ H_2]{} \text{Gluconolactone} \xrightarrow[+\ H_2O]{} \text{Acide gluconique}$$

La présence, parmi les métabolites de culture, de ces lactones, et de pentoses, confirme l'oxydation de la fonction aldéhyde, que cette oxydation se produise avec ou sans l'intermédiaire d'un dérivé phosphorylé. Mais il faut remarquer , que dans les deux types de culture, nous avons décelé la présence d'esters phosphorylés d'acides gras, qui témoignent du double phénomène d'oxydation et de phosphorylation. Ces esters phosphorylés (acylphosphates) avaient été plus particulièrement signalés chez certains germes anaérobies, ***Clostridium kluyveri*** par STADTMANN et BARKER (116) qui leur attribuent un rôle intermédiaire dans la formation synthétique d'acides gras.

La présence d'acide uroniques conjugués aux flavones celle des esters phosphorylés des sucres, celle des acylphosphates contribuent à démontrer le rôle important de ces mécanismes d'oxydation qui succèdent à l'hydrolyse de la cellulose, et qui se produisent à partir du glucose. Ces produits d'oxydation doivent donc bien être considérés comme des produits de synthèse et non comme des produits intermédiaires de la dégradation de la cellulose.

oOo

II - REACTIONS DE TRANSOSYLATION

HISTORIQUE

Au cours de ces dix dernières années, l'activité hydrolysante et l'activité transférante de certaines hydrolases, telles que les carbohydrases, les phosphorylases, ont été l'objet de nombreux travaux, tant sur des préparations enzymatiques d'origine végétale que sur des préparations d'origine bactérienne ou fongique. Et dans le domaine de la microbiologie, la synthèse de nombreux polyosides a trouvé une explication dans le mécanisme des réactions enzymatiques de transfert, mécanisme assuré par des galactosidases α ou β, par des glucosidases α ou β ou par des maltases.

Mécanisme des réactions de transfert.

Ces réactions de transfert ont été rapprochées des réactions d'hydrolyse que l'on peut schématiser de la façon suivante :

$$R - OX + H - OH \longrightarrow R - OH + H - OX \quad (1)$$

C'est le mécanisme type de l'hydrolyse, dans lequel le résidu osyl, R, appartient à un oside donateur R-OX. Cette réaction d'hydrolyse enzymatique se développe en milieu aqueux, mais si elle se produit dans un milieu où l'oside donateur se trouve à forte concentration (environ 10 à 30 % , P/V), ou si on ajoute un accepteur H-OR', R' se substituant à H dans la réaction (1), cette même réaction devient :

$$R - OX + H - OR' \longrightarrow R - OR' + H - OX \quad (2)$$

le composé R-OR' est donc un nouvel oside.

L'accepteur peut être un oside , (expérimentalement on choisit souvent le saccharose), ou un alcool primaire ou secondaire, les alcools tertiaires réagissent plus difficilement (COURTOIS (20), TO-DONG (124)) ou un poly-ol : glycerol, ou encore le donateur lui-même, s'il se trouve à une concentration élevée.

On peut d'une façon schématique considérer ces réactions de transfert et les réactions d'hydrolyse, comme des réactions de substitutions organiques OR' prenant la place de OX, sans qu'il y ait de changements de valence. Le mécanisme de ces réactions a été l'objet d'hypothèses proposées par KOSHLAND (61). La réaction (2) peut s'écrire par simplification :

$$B\text{-}X + Y \longrightarrow B\text{-}Y + X$$

dans laquelle B-X est donateur et Y accepteur. Cette réaction peut se faire :

- soit par un déplacement simple, l'enzyme permettant la juxtaposition des substrats et favorisant la réaction par polarisation des électrons. Y se fixerait à B avant que ne soit rompue la liaison B-X ;

- soit par un déplacement double qui nécessiterait l'intervention d'un agent de déplacement D ; dans un premier temps, l'enzyme forme un complexe E-B avec B, et simultanément la liaison B-X se rompt puis le complexe E-B se clive à son tour pour donner finalement B-Y.

Selon la position de la coupure du donateur B-X, si cette coupure se fait entre l'oxygène et le groupement qui détermine la spécificité de l'enzyme, les osides formés par transfert gardent la même configuration que celle des donateurs.

Activité transférante des microorganismes cellulolytiques.

L'activité transférante de β 1-4 glucosidases des microorganismes cellulolytiques a été plus spécialement étudiée chez les champignons, au même titre que le mécanisme de dégradation de la cellulose par ces microorganismes a été beaucoup plus analysé que celui des bactéries cellulolytiques.

Nous devons rappeler que par ce terme de β 1-4 glucosidase, on groupe des glucosidases ayant des spécificités différentes selon la structure de l'aglycone ; et, dans le cas particulier des β 1-4 glucosidases, il faut distinguer les glucosidases qui libèrent le glucose d'une chaîne d'osides à biose terminal, ce sont les cellobiases, les

laminaribiases, les gentiobiases, les sophorases (selon la structure du biose terminal), des arylglucosidases, qui libèrent le glucose d'un oside dont l'aglycone n'est pas un oside, mais un noyau de structure aryl comme celui du salicoside ou du paranitrophénol.

Cette distinction entre les osides donateurs et les osidases spécifiques se retrouve également dans les réactions de transfert pour le choix des accepteurs : l'action d'une aryl-glucosidase en présence d'un paranitrophényl-glucoside donateur, et d'alcool méthylique accepteur, conduit à la formation d'un méthyl-glucoside ; il y a transfert d'un résidu glucosyl sur un accepteur alcool. Dans le cas d'une cellobiase en présence d'un donateur tel que le cellobiose, qui a forte concentration joue le rôle de donateur et d'accepteur, il peut se former par déplacement du résidu glucosyl, des biosides isomères, et des homologues supérieurs des biosides ce que l'on peut schématiser de la façon suivante :

Cellobiose + Cellobiose ⟶ Cellotriose + glucose.

L'étude des β 1-4 glucosidases des champignons cellulolytiques a permis de mettre en évidence les propriétés transférantes dues, soit aux aryl-glucosidases, soit aux cellobiases, l'une et l'autre pouvant co-exister chez certaines espèces. En effet, en 1956, AITKEN (1), signalait dans le processus de dégradation de la cellulose par *Myrothecium verrucaria* la présence d'oligosaccharides synthétisés à partir de cellobiose mais ce champignon possède également une aryl-glucosidase, capable d'hydrolyser le salicoside et de transférer le glucose sur le méthanol pour donner un méthyl-glucoside (HASH et KING (43) . De même chez *Irpex* , NISIZAWA (84) , a montré le transfert de biose à partir d'un paranitrophénolcellobioside, pour former un méthylcellobioside.

L'activité transférante des cellobiases en présence de cellobiose donateur et accepteur a permis de mettre en évidence la formation d'oligosides de synthèse.

Les premiers travaux de AITKEN (1) sur le *Myrothecium*, et ceux de HASH et KING (43) sur ce même champignon, ont montré le rôle de la cellobiase dans cette synthèse d'oligosides. En présence de cellobiose à 10 %, il se forme des oligosides : tri, tétra, penta et hexaholosides, à liaison 1-4, qui donc appartiennent bien à une même série de dextrines.

A partir de *L'Aspergillus niger*, CROOK et STONE (22), puis KRISHNA-MURTI (62) , ont obtenu des oligosides de transfert par action de la cellobiase sur du cellobiose. Il se forme trois disaccharides à liaison 1-2, 1-3, 1-6 et deux trisaccharides : gentiotriose et cello-

triose. BUSTON et JABBAR (14), ont préparé également du cellotriose et du cellotétraose par action du *Chaetomium globosium*, sur le cellobiose ces deux oligosides ont été identifiés par chromatographie et par électrophorèse. Ils ont montré par ailleurs le caractère réversible de la réaction.

Ce rôle de la cellobiase est donc particulièrement important pour expliquer les mécanismes d'hydrolyse et de synthèse réalisés par l'enzyme : le cellobiose, produit de la dégradation de la cellulose, devenant accepteur, et permettant ainsi la synthèse de nouveaux oligosides, et de leurs polymères.

Spécificité de l'action transférante.

L'étude de l'action transférante de la cellobiase de *l'Aspergillus niger* a permis à CROOK (22) de mettre en évidence la formation de trois disaccharides, et de plusieurs trisaccharides. Les disaccharides formés par synthèse à partir du cellobiose sont caractérisés par des liaisons 1-2, 1-3 et 1-6, identifiés respectivement : sophorose, laminaribiose et gentiobiose ; les trisaccharides résultant du transfert du glucose en position 4 sur le cellobiose et en position 6 sur le gentiobiose, sont donc le cellotriose et le gentiotriose ; les deux autres trisaccharides sont formés par transfert du résidu glucosyl en 6 et en 3 sur le cellobiose, donnant des oligosides définis : 6 et 3 β Glucosylcellobiose.

Les liaisons se différencient par révélation des chromatogrammes par le réactif de SCHWIMMER et BEVENUE (110), qui donne des taches colorées différentes et spécifiques pour chacune de ces liaisons : la liaison du sophorose (1-2) se colorant en jaune, celle du laminaribiose en 1-3 est brun-vert, celle du cellobiose en 1-4 en bleue, et celle du gentiobiose en 1-6 est gris-brun.

Avec la cellobiase du *Myrothecium verrucaria*, HASH et KING (43) ont mis en évidence, par incubation en milieu cellobiose à forte concentration (10 %), des holosides : tri, tétra, penta et hexaholosides, qui se coloraient tous en bleu par le réactif de SCHWIMMER et BEVENUE (110).

Il ne semble donc pas que la spécificité du transfert soit très étroite, puisque les disaccharides se forment avec des liaisons en 2, 3 ou 6, de même le résidu glucosyl non réducteur se fixe sur la cellobiose en 4 pour donner le cellotriose, mais aussi en 3 ou en 6 formant ainsi le 3 et le 6 β glucosylcellobiose, à coloration bleue caractéristique. Mais il se pourrait que plusieurs cellobiases interviennent ayant chacune leur spécificité propre. La séparation d'enzymes transférantes ayant été réalisée sur des maltases d'origine animale

(LUKOMSKAYA (70) et sur des galactosidases d'origine végétale (TO DONG (I24)). Dans les deux cas les enzymes de transfert ont un optimum d'activité à un pH différent, et sont spécifiques du transfert sur un atome de carbone déterminé.

Au cours de l'expérimentation précédemment exposée, nous avons signalé la présence d'une cellobiase hydrolysante très active, et d'autre part, l'étude des oligosides formés dans les milieux de culture sur cellulose et sur cellobiose, nous a permis d'identifier des bioses à liaison 1-3 et 1-6, et des trisaccharides. Nous avons donc été amenés à rechercher si la cellobiase produite dans les milieux de culture ne possèdait pas aussi cette action transférante.

Cette réaction de transfert a été successivement étudiée sur un milieu cellobiose à 5 % puis à 2 °/₀₀, en faisant varier les conditions de pH et de durée de réaction.

A - TECHNIQUES UTILISEES

1 - Protocole opératoire des réactions de transfert.

Le test de réaction se fait sur 5 ml de solution aqueuse contenant 250 mg de cellobiose, en présence de tampon acétate ou phosphate, à concentration 0,01 M dans le milieu et de merthiolate de sodium (1 mg) et de la solution enzymatique.

La préparation enzymatique est obtenue à partir d'une culture de 15 jours de *Sporocytophaga* sur cellulose naturelle, Après élimination des débris de cellulose, on délipide cette culture par le butanol en pH 8, en deux phases selon la méthode de MORTON (82). Ce traitement est effectué d'une part sur la culture contenant des bactéries intactes, et d'autre part sur la même culture soumise à un traitement de broyage par les ultra-sons pendant I5 minutes. La phase aqueuse séparée après ce traitement, par une ultracentrifugation répétée deux fois, pendant trente minutes à 20.000 G, est ensuite précipitée par 0,7 volumes d'acétone à -20°C. Ce précipité maintenu pendant 20 heures à 0°, est séparé par centrifugation de dix minutes à 5.000 G et séché sous vide.

Les tampons sont préparés selon la méthode de Mac ILVAINE (73).

2 - Chromatographie

La technique est la même que celle qui a été précédemment utilisée. Papier ARCHES 310 ; solvant Butanol-Pyridine-Eau : 6-4-3. Le temps de migration étant de vingt quatre heures, et la révélation faite avec le révélateur de SCHWIMMER (110) utilisé en bain. Lorsqu'il est nécessaire, les échantillons à chromatographier sont concentrés sous vide à basse température.

3 - Electrophorèse.

Nous avons utilisé un tampon borate à pH 10, 0,025 M (Borate de sodium 51,6 g (PM380), dissout dans trois litres d'eau distillée, et additionné de deux litres de soude N/10). Le courant est de 900 volts et la durée de réaction de deux heures trois-quarts. Les témoins déposés : glucose, cellobiose, cellotriose , laminaribiose et gentiobiose sont à une concentration de 200 μ g et l'échantillon à examiner correspond à 70 μ ml du test cellobiose à 5 %. La révélation après séchage du papier est faite avec le réactif de SCHIMMER (110).

4 - Identification d'un oligoside après élution et hydrolyse d'une tache sur le chromatogramme.

La structure bi ou trisaccharide d'un oligoside a été précisée en découpant la tache à identifier, après avoir répéré sa position à la fois aux U.V. et par révélation d'une bande témoin ; l'élution de l'oligoside se fait par macération en eau distillée pendant vingt heures à 4° ; le surnageant séparé par centrifugation est ensuite concentré sous vide et on détermine le pouvoir réducteur sur des parties aliquotes avant et après hydrolyse de deux heures à 100° en milieu ClH N.

B - RESULTATS : CELLOBIOSE DONATEUR ET ACCEPTEUR

Nous avons étudié les réactions de transfert dans les conditions précitées, en utilisant une préparation enzymatique obtenue à partir d'une culture soumise à un traitement aux ultra-sons, et de la même culture non soumise à ce traitement, et nous avons comparé les produits de la réaction en pH 5,5, en fonction de la durée de la réaction ; le cellobiose étant à une concentration de 5 % . L'identification des oligosides est faite par chromatographie par comparaison avec des sucres témoins.

Nous avons répété cette même expérience en nous plaçant dans un milieu cellobiose à 2 °/₀₀, concentration analogue à celle utilisée dans le cas d'une culture sur cellobiose, et en employant successivement un pH de 5,5 et un pH de 7, et nous avons comparé les oligosides obtenus aux oligosides extraits du milieu de culture sur cellulose ou sur cellobiose.

a - Réactions de transfert sur cellobiose à 5 % .

1 - Réaction en pH 5,5, soit avec un tampon acétate soit avec un tampon phosphate 0,01 M.

La réaction a été mise en incubation pendant quinze heures à 37°, et la chromatographie faite sur un échantillon correspondant à 40 µl du milieu d'origine. La durée de la migration en chromatographie descendante est de vingt quatre heures, et on a identifié les oligosides par comparaison de la coloration des tâches, et des valeurs des R.G. donnés par les témoins utilisés dans les mêmes conditions. Nous avons ainsi pu déterminer : (fig. 18)

- Présence de Cellobiose et de Glucose dont les R.G. sont respectivement de 0,70 et de 1.

- Présence de deux Bioses :

  . l'un migrant comme le laminaribiose, ayant un R.G. de 0,83, se colorant en brun-vert, que l'on identifie au laminaribiose, liaison 1-3 (R.G. témoin : 0,85).

  . l'autre migrant moins vite que le cellobiose R.G. = 0,58, et se colorant en gris-brun comme le gentiobiose dont le R.G. = 0,58 ; on a identifié ce sucre comme le gentobiose à liaison 1-6.

- Présence d'un trisaccharide, migrant comme le cellotriose R.G. = 0,32, dont il a la même coloration bleue identifié comme le cellotriose.

- Présence d'un oligoside migrant entre le cellotriose et le gentiobiose, ayant un R.G. de 0,48, et se colorant en bleu, mais ne pouvant être comparé à aucun des témoins utilisés. Sa coloration bleue révèle sa liaison 1-4, il pourrait donc s'agir d'un trisaccharide résultant du transfert sur le cellobiose d'un résidu non réducteur glucosyl, en une position autre que le quatrième carbone.

Les résultats sont identiques en milieu tampon acétate ou phosphate. De même les résultats obtenus avec la préparation enzymatique soumise aux ultra-sons sont analogues à ceux obtenus avec la préparation extracellulaire, mais les taches de glucose dans le premier cas sont un peu plus intenses, et les dosages de glucose libre dans le milieu de transfert exposés dans un prochain paragraphe confirmeront ces résultats.

2 - Développement de la réaction en fonction de la durée :

en pratiquant les prélèvements après 30' , 90', 4 heures, 1, 3 et 6 jours. La réaction est faite en tampon acétate 0,01 M, à pH 5,5 et sur les deux extraits enzymatiques.

On a noté les résultats suivants : (Fig. 19) :

- au temps 0 : présence de cellobiose

- après 30' : le chromatogramme révèle la présence de glucose et de cellotriose ; une traînée due à la forte concentration de cellobiose ne permet pas la lecture d'autres taches.

- après 90' : et après 4 heures, il se forme en plus des holosides :

  - un biholoside identifié laminaribiose

  - un triholoside à réaction bleue, dont le R.G. est de 0,50

- après 1,3 et 6 jours, les résultats obtenus confirment ceux du prélèvement précédent, mais apparait en plus le gentiobiose, coloré en gris-brun, et dont le R.G. est de 0,59, et un autre oligoside, à coloration bleue, dont le RG = 0,38 le situe entre le cellotriose et le trisaccharide déjà signalé après 90'.

Nous pouvons à la lecture de ces résultats constater que le premier temps de la réaction révèle la formation du glucose et du trisaccharide cellotriose à liaison 4 qui est donc le premier oligoside de synthèse, homologue supérieur du cellobiose.

Les deux oligosides (bi) à liaison 1-3 et 1-6, sont décelés respectivement après 90' et 24 heures, et deux autres oligosides à liaison 1-4 apparaissent dans les mêmes temps que le laminaribiose et le gentiobiose. Leur coloration bleue et leur migration suggèrent une structure de trisaccharide, ayant une liaison 1-4.

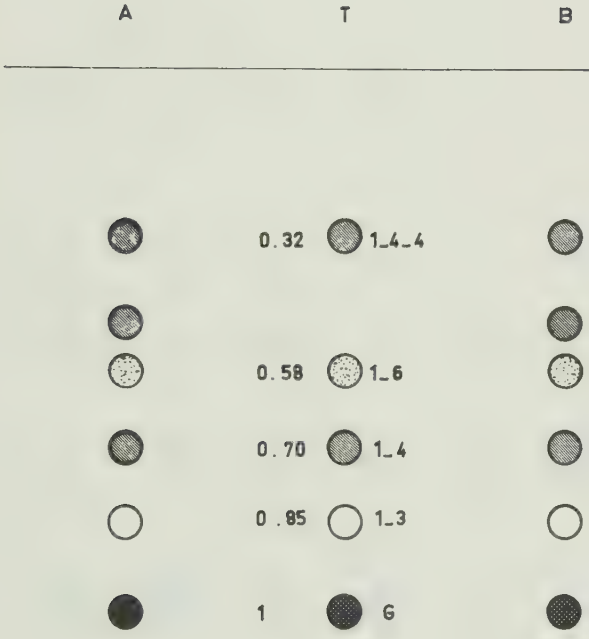


Fig.18.Chromatogramme .
Activité de Transglucosylation . Cellobiose 5% .
A tampon acétate pH5,5 - Btampon phosphate pH5,5.
Mêmes indications que sur la Fig.12.Solvant 1 .
Les chiffres indiquent les valeurs des R.G.

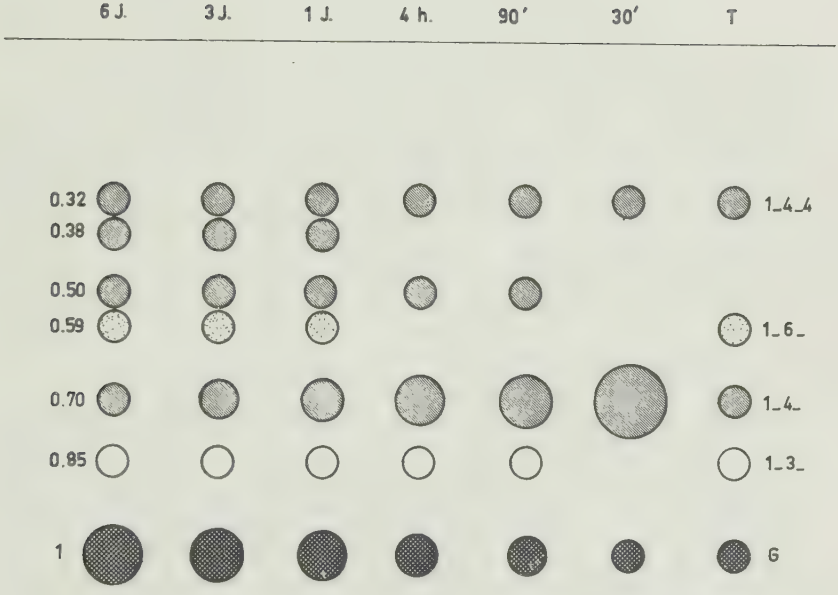


Fig.19. Chromatogramme.
Activité de transglucosylation . Cellobiose 5% .
Formation des Oligosides en fonction du temps.
Mêmes indications que sur la Fig. 18 .

Des dosages de glucose sur les échantillons prélevés après 30' ; 90', 4 et 24 heures, ont permis de suivre l'accumulation du glucose libéré et ne participant pas à la réaction de transfert.

3 - Recherche de la structure de l'oligoside dont le R.G. est de 0,50.

Nous avons essayé de confirmer la présence de trois unités de glucose dans la structure de l'oligoside présent après 90' et se colorant en bleu.

Un premier essai de séparation par électrophorèse des différents sucres présents dans la réaction de transfert ne nous a pas permis d'effectuer une bonne séparation des di et trisaccharides à liaison β 1-4. Les échantillons témoins de glucose gentiobiose et laminaribiose ont une migration de 1, de 0,76 et de 0,48, mais la migration des β 1-4 est beaucoup moins importante et nous avons noté respectivement pour le cellobiose et pour le cellotriose 0,15 et 0,12 ce qui ne nous permettait pas d'envisager l'utilisation de cette technique pour la séparation d'un trisaccharide ayant au moins une liaison en 1-4.

Aussi nous avons eu recours à l'isolement de la tache à étudier sur le chromatogramme, et après avoir élué le sucre nous avons vérifié son pouvoir réducteur avant et après hydrolyse. Le rappport de 1 à 3 nous a permis de caractériser ce sucre comme étant un trisaccharide. On peut donc penser qu'il résulterait du transfert d'un résidu glucosyl non réducteur sur le cellobiose par une liaison autre que la liaison 1-4 qui caractérise le cellotriose. De tels sucres ont été identifiés 6 β ou 3 β glucosylcellobiose dans les réactions de transfert des cellobiases de ***L'Aspergillus niger***.

4 - Rendement de la réaction.

Il est difficile de déterminer le rendement de la réaction puisque nous ne pouvons pas doser le cellobiose seul dans le mélange d'oligosides. Nous avons seulement suivi la concentration du glucose dans le développement de la réaction lors des prélèvements effectués après 30', 90', 4 heures, 1, 3 , 6 jours ; le dosage du glucose se faisant par la méthode au glucostat, ce qui nous a permis d'établir les courbes sur les deux extraits enzymatiques d'origine extra ou intracellulaire. Le cellobiose transformé est évidemment en quantité supérieure à celle que l'on pourrait calculer d'après la quantité de glucose libre dosable au glucostat. On ne note pas de différences interprétables entre les deux extraits.

b - Réactions de transfert sur cellobiose à 2 ‰ .

Nous avons utilisé la concentration de 2 °/₀₀ par comparaison avec celle du milieu de culture liquide qui a permis l'observation des oligosides formés après incubation à 28°. Comme pour l'étude du transfert en milieu cellobiose à 5 % nous avons déterminé par chromatographie les oligosides résultant de ce transfert , en fonction de la durée de la réaction et du pH.

1 - Développement de la réaction en fonction du temps (Fig. 20) :

Le protocole expérimental est analogue à celui utilisé avec la solution concentrée de cellobiose, il est seulement nécessaire de concentrer sous-vide le prélèvement à chromatographier, de façon à déposer sensiblement la même quantité de sucre que dans le test à 5 %. La préparation enzymatique est la même que celle employée précédemment. Ce test est pratiqué en pH 5,5 et les prélèvements ont été faits après 30', 4 heures , 1, 3 et 6 jours ce qui nous a permis de suivre le déroulement de la réaction :

- après 30' : présence de cellobiose et de glucose.
  - . formation de deux biholosides correspondant au laminaribiose à liaison 1-3 et au gentiobiose à liaison I-6
  - . formation de trois triholosides dont deux sont colorés en bleu, l'un ayant un R.G. de 0,32, comme le cellotriose, 4 β-glucosylcellobiose, l'autre ayant un R.G. de 0,48 comme celui que nous avions analysé dans le cas du transfert sur cellobiose à 5 %. Le troisième triholoside est brun-vert et son R.G. est 0,52.
- après 4 heures :
  - . le cellobiose est à une concentration plus faible qu'initialement, et le glucose au contraire s'accumule.
  - . les autres oligosides (bi ou tri) se concentrent également.
- après 24 heures :
  - . la disparition des deux biholosides : cellobiose et laminaribiose est totale.
  - . seul persiste le gentiobiose comme bioside.
  - . le cellotriose et les deux autres trisaccharides décelés dès la trentième minute sont présents.

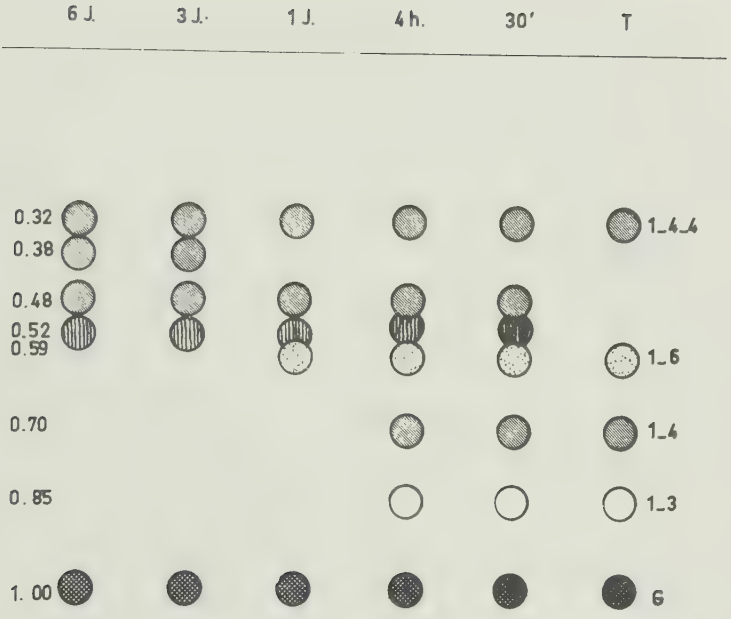


Fig.20. Chromatogramme .
Activité de Transglucosylation . Cellobiose 2‰
Formation d'Oligosides en fonction du temps .
Mêmes indications que sur la Fig.18.

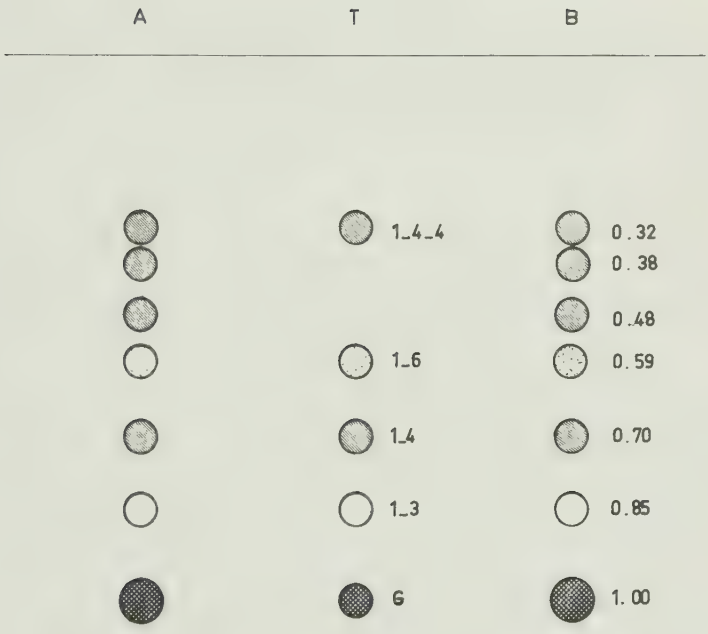


Fig.21. Chromatogramme .
Activité de transglucosylation .Cellobiose 2‰.
Formation d'Oligosides . A tampon acétate pH5,5
B tampon phosphate ph7
Mêmes indications que sur la Fig. 18 .

- après trois jours :

  . disparition totale des diholosides

  . présence de glucose, de cellotriose et de deux trisaccharides bleus (donc ayant au moins une liaison 1-4).

- après six jours : même réaction.

2 - Influence du pH (Fig. 21) :

Nous avons répété la même expérience que précédemment en opérant en pH 7, tampon phosphate 0,01 M, et nous avons obtenu les mêmes résultats, ce qui nous replaçait exactement dans les conditions de la culture sur cellobiose à 2 °/oo

Conclusions :

1 - Les résultats obtenus dans les réactions de transfert, en se plaçant successivement dans un milieu à 5 % de cellobiose, et dans un milieu à 2 °/oo sont donc comparables.

Dans les deux cas, nous observons la formation de biholosides avec des liaisons 1-3 et 1-6, et la formation de triholosides , ceux-ci résultant du transfert du résidu glucosyl sur le cellobiose dans le cas du cellotriose, en position 4, ces sucres ayant pu être identifiés par comparaison avec les témoins dont nous disposions. Les deux autres triholosides se colorant en bleu, donc possèdant aussi une liaison 1-4 résulteraient du transfert du résidu glucosyl sur un autre hydroxyle, peut être en 3 ou en 6.

La concentration de 2 °/oo qui semble faible par rapport aux concentrations de 5 ou 8 % généralement utilisées pour mettre en évidence ces réactions de transfert, correspond néanmoins à une concentration relativement élevée dans le cas particulier du microorganisme considéré. Nous avions noté précédemment que le pouvoir réducteur total du milieu de culture correspondait à 0,030/ml exprimé en mg de glucose) et que le glucose était à une concentration de 0,005 °/oo. On comprend ainsi que la concentration expérimentale de 2 °/oo en cellobiose puisse être considérée comme une concentration relativement élevée. Cette concentration de 2 °/oo explique donc bien dans le cas des cellobiases du *Sporocytophaga.* la possibilité de réactions de transfert, et la présence d'oligosides dans les milieux de culture sur cellobiose ou sur cellulose.

2 - Les résultats identiques donnés par l'expérimentation en pH 5,5 et en pH 7, confirment les transferts en position 4,3 et 6, montrent l'étendue de l'action de la cellobiase transférante, sans qu'on puisse présumer , sur cette préparation brute, d'une éventuelle spécificité du transfert en relation avec le pH, comme il a été démontré dans le cas des maltases (LUKOMSKAYA (70) et des galactosidases TO-DONG (124).

3 - Les préparations enzymatiques extraites des cultures soumises aux ultra-sons ont donné des résultats sensiblement identiques à ceux observés avec les préparations non soumises à ce traitement. On ne peut donc pas envisager une particulière localisation intra-cellulaire de cette activité transférante.

Le traitement au butanol, par la méthode de MORTON (12), permet une dissociation plus complète des lipoprotéines du mucopolyoside qui enrobe les bactéries, et permet ainsi d'obtenir une solubilisation plus complète des protéines en phase aqueuse.

4 - L'étude cinétique de cette transosylation nous permet de suivre cette synthèse des oligosides, et plus particulièrement dans le cas du transfert à 2 °/₀₀ après trente minutes, on observe la présence de biholosides à liaison 1-3 et 1-6 et la présence triholosides colorés en bleu donc résultant du transfert du résidu glucosyl sur le cellobiose , mais aussi la présence de triholosides colorés en brun-vert qui peuvent aussi résulter du transfert du résidu glucosyl sur un autre biose que le cellobiose.

Après 24 heures d'incubation , les biholosides à liaison 1-4, 1-3 et 1-6 donc le cellobiose, laminaribiose et gentiobiose ont disparu, et on note la présence des trisaccharides précédemment énumérés et du glucose ; il semble donc que la disparition des biholosides et la formation d'homologues supérieurs soient ainsi démontrées.

Il faut noter que dans tous les prélèvements des réactions de dégradation par hydrolyse nous avons toujours constaté la présence de glucose. Le glucose trouvé dans les cultures sur cellulose est donc dû pour une part à l'hydrolyse des chaînes longues et insolubles de la cellulose par une cellulase inactive sur les chaînes courtes, mais pour une autre part il résulte de l'action des cellobiases agissant sur des chaînes courtes, à cellobiose terminal : l'hydrolyse en libère du glucose dont une partie est transférée et permet ainsi les réactions de synthèse à partir des éléments de la dégradation de la cellulose.

5 - Mécanisme de réaction :

Dans toutes ces réactions le cellobiose joue le rôle de donateur et d'accepteur. En effet son hydrolyse libère le glucose et d'autre part la formation des triholosides à coloration bleue met en évidence son rôle d'accepteur d'un résidu glucosyl.

La formation des diholosides à liaison 1-3 et 1-6 peut s'expliquer par la première hypothèse de KOSHLAND (61), du déplacement simple, le cellobiose fixant un résidu glucosyl avant de rompre sa liaison caractéristique en 1-4.

La formation du cellotriose avec sa liaison en 4 du résidu glucosyl serait peut être due à une réaction de déplacement double, qui conserve au triholoside formé la configuration du donateur, la rupture de la liaison osidique devant se faire entre le groupement qui détermine la spécificité de l'enzyme et l'oxygène.

Les transferts sur des liaisons différentes, en 3 ou en 6 sont peut-être gouvernés par des cellobiases spécifiques de chaque liaison, rompant cette liaison spécifique de façon différente.

C - RESULTATS : GLUCOSE ACCEPTEUR

L'étude des mécanismes de dégradation de la cellulose nous a permis de mettre en évidence la présence de glucose quelle que soit la nature du substrat utilisé : insoluble ou soluble, et la formation de certains oligosides qu'on ne peut identifier comme étant le cellobiose ou le cellotriose, ou l'un des homologues supérieurs du cellobiose, élément constitutif de la cellulose ; ces oligosides sont donc des produits de synthèse.

D'autre part, les cultures des *Sporocytophaga* dans un milieu minéral contenant du glucose s'accompagne de la formation d'oligosides issus de synthèses bactériennes. Puisque les enzymes de ces mêmes *Sporocytophaga* possèdent une activité transférante, mise en évidence lorsque le cellobiose joue le rôle de donateur et d'accepteur de glucose, nous avons étudié cette activité transférante en remplaçant le cellobiose par le glucose ; nous avons comparé ces oligosides d'une part à ceux obtenus par culture des *Sporocytophaga* dans un milieu synthétique glucosé, et d'autre part à ceux qui sont présents dans le tests de dégradation enzymatique de la cellulose de HARMSEN.

1 - Techniques.

Ce sont celles qui ont été précédemment exposées pour le test sur cellobiose, le glucose étant utilisé à la concentration de 2 °/₀₀ en pH 7 (tampon Tris). Les chromatogrammes ont été faits en utilisant comme solvants les mélanges :

Propanol - Acétate d'éthyle-Eau : 6-1-3
Butanol - Ethanol-ac. acétique-Eau : 4-1-1-1.

qui permettent une meilleure séparation des oligosides à poids moléculaire plus élevé, et comme révélateur le réactif de SCHWIMMER et BEVENUE (110).

2 - Résultats (Fig. 22).

Nous avons pu mettre en évidence après 30' et 1 heure d'incubation à 37°, la formation d'oligoside présentant le même R.G. que le cellobiose, et se colorant en bleu comme ce dernier par le révélateur de SCHWIMMER et BEVENUE (110).

Après 20 heures nous avons noté la présence de deux autres oligosides dont les R.G. sont de 0,33 et de 0,45 , et qui à la révélation apparaissent avec la coloration bleue caractéristique ; ces oligosides possèdent donc une liaison 1-4. Il faut remarquer que le R.G. de 0,33 est analogue à celui du cellotriose utilisé comme témoin ; la migration de l'autre oligoside le situe entre le cellobiose et le cellotriose.

Cette expérimentation nous montre donc que les enzymes de cette fraction des *Sporocytophaga* , peuvent synthétiser des oligosides :

- Cellobiose et cellotriose possèdant les liaisons 1-4 caractéristiques des molécules de glucose qui constituent les chaînes de la cellulose.

- Et un autre oligoside, (tri), dont deux des molécules de glucose sont reliées par une liaison 1-4, et la troisième étant fixée sur un autre hydroxyle que celui du carbone 4, comme dans le cas du transfert sur cellobiose (3 ou 6).

On peut penser que le cellobiose qui se forme dans le premier temps de la réaction (30') sert à la fixation des molécules de glucose sur ce noyau dimère en position (4 ou 6).

- D'autre part, l'étude des oligosides formés par les *Cytophaga* dans un milieu de culture minéral contenant du glucose (2 °/₀₀) nous a permis de constater que les oligosides qui se forment sont d'abord le cellobiose, puis des oligosides (tri et tétraholosides) ayant au

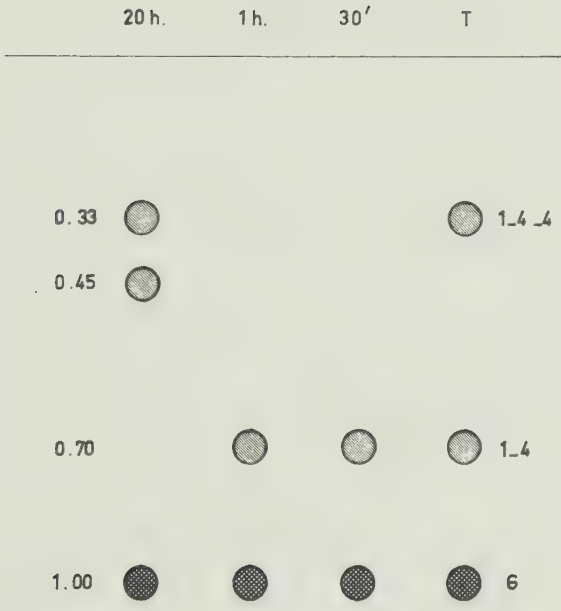


Fig.22. Chromatogramme
Activité de transglucosylation. Glucose 2‰.
Formation des Oligosides en fonction du temps.
Solvant 2 .Mêmes indications que sur la Fig. 18.

moins une liaison 1-4. Leur séparation a été faite par chromatographie selon les techniques précédemment exposées.

- L'étude de ces réactions de transfert à partir du glucose peut nous permettre deux hypothèses sur la présence de ces différents oligosides à liaison 1-4 que nous avions observés lors de l'étude de l'activité de cette même fraction cellobiase sur la cellulose de HARMSEN. En effet ces oligosides peuvent provenir :

. soit de dégradation de la cellulose par la cellobiase, les chaînes courtes de la cellulose de HARMSEN, libérant du glucose , deviennent de plus en plus courtes, et peuvent donc se présenter sous forme de chaînes à 4, 3, 2 molécules de glucose, correspondant au cellotétraose, triose, biose;

. soit de réactions de transfert, le glucose libéré dans le premier temps de la réaction enzymatique se concentrant et servant alors d'accepteur aux nouvelles molécules de glucose progressivement libérées du substrat cellulose par le mécanisme d'hydrolyse.

Si l'origine de ces oligosides : cellobiose, triose et tétraose peut s'expliquer par l'un ou l'autre de ces mécanismes d'activité des β glucosidases, dégradation ou transfert, il est certain que celle des autres oligosides, ayant au moins une structure 1-4 est uniquement due aux mécanismes de transfert, ce qui confirme leur origine synthétique.

3 - Recherche du donateur dans le cas des réactions de transfert sur glucose à 2 °/₀₀.

Dans le cas des réactions de transfert sur cellobiose, l'origine du donateur s'explique par l'hydrolyse du cellobiose par la cellobiase en deux molécules de glucose qui viennent se fixer sur le cellobiose accepteur . Mais dans le cas du transfert en milieu glucose l'origine du glucose donné reste encore inexpliquée. Nous avons remarqué que le premier biose formé après 30' est le cellobiose, et que les oligosides synthétisés ensuite contiennent ce dimère. Le cellobiose est-il libéré du complexe enzymatique cellobiase, par la concentration élevée en glucose, dans le milieu de réaction, ou au contraire résulte-t-il de l'union de deux molécules de glucose, l'une d'elles pouvant être un glucose-phosphate ?

Un tel mécanisme de synthèse a été observé par MAC BEE (72) et ses collaborateurs et ensuite plus étudié par ALEXANDER (2), avec les enzymes d'une bactérie cellulolytique le ***Clostridium thermocellum.***

Ces enzymes à partir du glucose 1-phosphate et du D glucose peuvent synthétiser du cellobiose (4-0-β-D-glucopyranosyl-D-glucopyranose). Le glucose accepteur pouvant être remplacé par le xylose, le déoxyglucose ou par la glucosamine, et donnant alors lieu à la formation de bioses mixtes ; dans le cas du xylose le biose formé est le 4-0-β-D-glucopyranosyl-D-xylopyranose. Cette réaction schématisée de la façon suivant s'accompagne toujours de libération de phosphore :

Glucose + Glucose -1 phosphate -------> Cellobiose + phosphate.

- Une autre hypothèse sur l'origine du donateur est celle de l'intervention des nucléotides. Cette intervention des substances nucléiques : uridine-diphosphate-glucose (UDPG) ou guanosine-diphosphate-glucose a été démontrée à plusieurs reprises pour expliquer le mécanisme de synthèse d'oligosides.

LELOIR & CABIB (65) ont démontré la synthèse du sucrose à partir du fructose et de l'UDPG, selon le schéma :

UDPG + Fructose ——————> Sucrose + UDP.

l'UDPG ne pouvant être remplacé dans ce cas par le Glucosel-phosphate .

La synthèse de la cellulose, par l' ***Acétobacter xylinum***, nécessite aussi comme l'ont démontré GLASER (37) puis WEIGL (128) l'intervention de l'UDPG :

UDPG + (Glucose)n ——————> UDP + (Glucose)n + 1

Plus récemment ELBEIN, BARBER et HASSID, utilisant des enzymes isolés du haricot(***Phaseolus aureus***)ont synthétisé de la cellulose en présence de guanosine-diphosphate-glucose donateur de glucose; ce donateur ne pouvant être remplacé ni par le glucose ni par le glucose-1-phosphate. Toutes ces réactions de synthèse à partir de nucléotides s'accompagnent de libération de phosphore.

De même , la synthèse d'oligoxylanes a été démontrée par FEINGOLD (31). Le donateur étant également l'uridine-diphosphate, et le sucre lié le xylose. Ce donateur en présence d'oligoxylane et d' un extrait enzymatique d' ***Asparagus*** permet la synthèse d'homologues supérieurs des xylanes.

LAVINTMAN (64) a également extrait du maïs un enzyme capable de transférer le glucose de l'ADPG ou de l'UDPG sur l'amidon avec une structure ramifiée.

Sachant que les enzymes des *Sporocytophaga* étaient liés à des substances nucléiques (mise en évidence d'ADN et d'ARN), nous avons recherché la libération de ce phosphore minéral au cours des réactions de transfert (par la méthode de DELSAL) (24) et nous avons constaté au contraire que cette réaction s'accompagnait dans son premier temps d'une certaine consommation de phosphore.

L'origine même de ce mécanisme en présence de glucose accepteur ne semble donc pas être encore résolue. S'il est intéressant de souligner à la fois la présence constante de glucose parmi les produits de dégradation de la cellulose, et celle de dérivés phosphorylés qui sont ensuite synthétisés, il faut aussi souligner que les oligosides formés au cours du transfert sur le glucose possèdent tout au moins une liaison 1-4 typique de la structure de la cellulose.

oOo

CONCLUSIONS GENERALES

Nous avons au cours de ces premières études sur l'activité enzymatique des ***Sporocytophaga*** du sol, en utilisant des substrats insolubles et des substrats solubles, tenté :

1 - de déterminer les conditions d'action de ces microorganismes : pH, température, durée de réaction, concentration ;

2 - d'identifier les produits résultant de la lyse de ces deux types de substrats, soit par une préparation enzymatique brute, totale, soit par des fractions d'enzymes.

Ce qui nous a amené à considérer les deux activités : de dégradation et de synthèse permises par l'équipement enzymatique de ces germes.

Ils peuvent en effet, dégrader un substrat aussi insoluble que la cellulose, jusqu'en ses éléments constitutifs les plus simples: cellobiose et glucose, mais aussi synthétiser de nouveaux composés à partir de ces mêmes éléments constitutifs.

Cette activité de synthèse , se manifeste, soit par des processus d'oxydation, dont les acides uroniques sont les représentants les plus anciennement connus, accompagnés par des dérivés phosphorylés, soit par des processus de transosylation, ces processus étant assumés par les enzymes mêmes qui dégradent la cellulose.

Tous ces composés : oligosides de dégradation ou de synthèse, dérivés phosphorylés, et acides uroniques contribuent à la formation de ce mucopolyoside bactérien qui a toujours été considéré comme un élément très caractéristique de l'activité de ces bactéries cellulolytiques du sol.

A - Mécanismes de DEGRADATION de la cellulose.

1 - Etude quantitative :

L'étude quantitative de l'activité enzymatique d'une culture pure (en présence de bactériostatique) sur un substrat insoluble ou soluble, se traduit par la formation de sucres réducteurs ; ceux-ci sont formés en beaucoup plus grande quantité lorsque le substrat est soluble ; la longueur des chaînes (degré de polymérisation) n'intervenant que très peu.

Les conditions optima de réaction sur un substrat insoluble sont : pH 7,5 à 37° avec une incubation de quatre à cinq jours, mais il faut noter les limites de pH de 5,5 à 8,5 et de températures entre 28 et 45°.

Dans le cas d'un substrat soluble , les variations dues au pH sont moins sensibles entre pH 4,5 et 8,5 ; l'optimum d'action se situant entre pH 6 et pH 7. La température de 28° permet le meilleur rendement de la réaction qui décroit ensuite de 37 à 45°. Cette réaction est complète après quatre heures d'incubation et croit avec la concentration en substrat (8,5 °/oo correspondant à la limite de solubilité de ce substrat).

2 - Etude qualitative:

a - L'étude qualitative des produits issus de l'activité enzymatique d'une préparation brute nous a permis de mettre en évidence d'une part des oligosides : glucose, cellobiose , cellotriose, résultant de la coupure des chaines homogènes de la cellulose, d'autre part des oligosides ne possèdant pas ces liaisons 1-4, mais des liaisons en 1-3 et en 1-6, et également des dérivés phosphorylés. La formation de ces oligosides liés en 1-3 et en 1-6 révèle donc un nouvel aspect de l'activité enzymatique des *Sporocytophaga* : la dégradation enzymatique de la cellulose s'accompagne de phénomènes de synthèse. Ces phénomènes de synthèse sont étudiés séparément dans la seconde partie de notre travail.

Nous avons complété cette étude qualitative des produits issus de l'activité enzymatique des *Sporocytophaga* en faisant des fractionnements d'enzyme par l'acétone.

Deux fractions ont été étudiées : l'une active sur le cellobiose, les chaînes solubles, et faiblement active sur la cellulose insoluble dite "fraction cellobiase", précipitable par 70 % d'acétone, l'autre inactive sur le cellobiose, mais active sur les chaines insolubles, dite "fraction cellulase" obtenue après élimination de la fraction cellobiase. L'une et l'autre de ces deux fractions peuvent détacher le glucose du substrat qui leur est spécifique, ce qui dé-

montre par ailleurs que le cellobiose n'est pas un intermédiaire obligatoire dans le processus de dégradation. D'autre part, le glucose est accompagné de produits de synthèse oligosides ayant au moins une liaison 1-4 dans le cas de la fraction cellobiase, et oligosides phosphorylés dans le cas de la fraction cellulase.

b - Cette même étude qualitative nous a permis de préciser le mécanisme de dégradatation. Le premier temps de l'attaque de la cellulose insoluble, sa transformation en chaines linéaires solubles est liée à la présence d'enzymes fixés à la paroi bactérienne et non diffusibles.

La dégradation du substrat solubilisé se fait par une coupure des chaines linéaires au "hasard" les réduisant en chaines réductrices dont elles séparent le glucose et des oligosides à 2, 3, 4 molécules de glucose liées en 1-4. L'enzyme n'agit donc pas en libérant le glucose de l'extrémité des chaînes, mais en les coupant en un point quelconque.

On peut donc penser que la dégradation de la cellulose se fait par une mosaïque d'enzymes agissant selon un même mécanisme sur des substrats plus ou moins longs pour en libérer du glucose et des oligosides selon l'endroit où se fait la coupure de la chaîne.

B - Mécanismes de SYNTHESES.

La formation de mucus dans les cultures sur cellulose et sur glucose démontre l'origine de ce composé qui ne peut être confondu avec un produit intermédiaire de la dégradation de la cellulose. Cette activité de synthèse des *Sporocytophaga* à été envisagée sous deux aspects particuliers :

- activité démontrant les processus d'oxydation à partir des sucres issus de la dégradation de la cellulose : formation d'acides uroniques et des dérivés phosphorylés.

- activité de synthèse par transosylation à partir de ces mêmes sucres issus de la lyse de la cellulose.

1 - Les phénomènes d'oxydation communs aux cultures sur cellulose et sur glucose, ayant donc bien comme substrat de départ le glucose, engendrent la formation :

a - d'acides uroniques décelables après la phase exponentielle et rapidement liés au pigment jaune des *Sporocytophaga*, d'où ils sont libérés par hydrolyse acide (2N, 100°, 1 heure)

b - de dérivés phosphorylés. Ces esters sont d'une part des esters des sucres acides, et d'autre part des esters d'acides organiques (acylphosphates). Il faut noter également la présence importante de nucléotides et d'acides nucléiques.

2 - Les phénomènes de transosylation ont été mis en évidence :

a - sur le Cellobiose à la concentration de 5 % et de 2 °/₀₀, et ont permis de vérifier la formation d'oligosides à :

- structure homogène 1-4 : Cellotriose
- structure mixte : 1-4 et une autre liaison
- structure homogène à liaison 1-3 ou 1-6 : laminaribiose et gentiobiose.

b - sur le Glucose à 2 °/₀₀. Le glucose même à cette concentration permet la synthèse d'oligosides :

- structure homogène 1-4 : cellobiose et cellotriose
- structure mixte : 1-4 et une autre liaison.

mais nous n'avons jamais constaté la présence d'oligosides à structure homogène 1-3 ou 1-6 (homologues supérieurs du laminaribiose ou du gentiobiose).

La présence,parmi les produits issus de l'activité enzymatique sur la cellulose, de ces mêmes oligosides à structure homogène ou mixte : 1-4 et X, fait donc apparaitre la superposition de ces deux mécanismes de dégradation et de transfert.

Et c'est ce double aspect de l'activité des enzymes des *Sporocytophaga* du sol, que nous nous sommes efforcés de souligner dans cette première étude.

En effet ces microorganismes sont capables par leurs enzymes : cellobiases et cellulases, de dégrader le cellulose et d'en libérer le glucose. Mais cette activité d'hydrolyse est accompagnée d'une activité de transosylation accomplie par ces mêmes enzymes, qui donne naissance à des oligosides supérieurs. D'autre part, le glucose libéré par hydrolyse de la cellulose est l'objet d'autres synthèses, dont certaines traduisent l'importance du phénomène d'oxydation avec la formation d'acides uroniques et de dérivés phosphorylés.

Ainsi se trouvent étroitement associés ces différents mécanismes d'hydrolyse, de transosylation, et d'oxydation, qui contribuent à la formation du mucopolyoside colloïdal, réserve de composés organiques directement assimilables par d'autres microorganismes du sol.

Vu, le Président de Thèse :
Pr LAMBIN.

Vu, le Doyen de la Faculté :
Pr VALETTE.

Vu et Permis d'imprimer
Le Recteur de l'Académie de Paris

J. ROCHE.

BIBLIOGRAPHIE

1 - AITKEN R.A., EDDY B.P., INGRAM M., WEURMAN C.-

The action of culture filtrates of the fungus ***Myrothecium verrucaria*** on β glucosans.
Biochem. J. 1956, 64 , 63

2 - ALEXANDER J.K.-

Characteristics of cellobiose phosphorylase.
J. Bact. 1961, 81, n° 6, 903.

3 - ANDERSON F.B. and MANNERS D.J.-

Studies on carbohydrates-metabolizing enzymes, trans-β glucosylation by barley enzymes.
Biochem. J. I959, 71, 407.

4 - AYERS W.A.-

Phosphorolysis and synthesis of cellobiose by cell extracts from ***Ruminococcus flavefaciens.***
J. Biol. Chem. 1959, 234, 2819.

5 - BISSET K.A.-

The cytology and life history of bacteria.
BALTIMORE : WILLIAMS WILKINS Co . 1950.

6 - BISSET K.A.-

The cytology and life history of bacteria.
2nd. Ed. p. 40.
LIVINGSTONE. EDINBURGH, I955.

7 - BLUM R. , STAHL W.H.-

Enzymic degradation of cellulose fibers.
Text. Res. J. 1952, 22, 178.

8 - BOREL E., HOSTETTLER F., DEUEL H. -

Quantitative Zuckerbestimmung mit 3-5 dinitrosalicylsäure und phenol.
Helv. Chim. Acta., 1952, 35, 115.

9 - BOSWELL J.G. -

The biological decomposition of cellulose.
New Phytologist. 1941, 40, 20.

10 - BOULANGER P., MONTREUIL J. -

Etudes sur les acides nucléiques. I- Chromatographie quantitative sur papier des ribonucléotides.
Bull. Soc. Chim. Biol. I95I, 33, 784.

11 - BRODIE A.F. , LIPMANN F. -

Identification of a gluconolactonase.
J. Biol. Chem. 1955, 212, 677.

12 - BURROWS S., GRYLLS F.S., HARRISON J.S. -

Paperchromatography of phosphoric esters
Nature 1952, 170, 800.

13 - BURTON K. -

A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine réaction for the colorimetric estimation of desoxyribonucleic acid.
Biochem. J. 1956, 62, 315.

14 - BUSTON H.W., JABBAR A. -

Synthesis of β linked glucosaccharides by extracts of *Chaetomium globosum.*
Biochem. Biophys. Acta. 1954, 15, 543.

15 - CARSON R.J., EAQON R.G. -

Cellular desintegration with concomitant release of slime and production of extracellular mannan by Pseudomonas aeruginosa : Two separate phenomena.
Canad. J. Microbiol. 1964, 10, 467.

16 - CHANDA N.B., HIRST E.L., MANNERS D.J. -

A comparison of isolichenin and lichenin from Iceland moss *Cetraria islandica)*
J. Chem. Soc. 1957, 1951.

17 - COHEN S.S. -

Gluconokinase and the oxidative path of glucose-6-phosphate utilization.
J. Biol. Chem. 1951, 189, 6I7.

18 - COOKE T.F., BUSENBURY J.H., KIENLE R.H., LINEKEN E.E -

Mechanism of imparting wrinkle recovery to cellulosic fabrics.
Text. Res. J. 1954, 24, 1015.

19 - CORI O., LIPMANN F.-

The primary oxidation product of enzymatic glucose-6-phosphate oxidation.
J. Biol. Chem. 1952, 194, 417.

20 - COURTOIS J.E., LECLERC M.-

Etude de l'action transférante de la β glucosidase de l'émulsine d'amande.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1956, 38, 365.

21 - COURTOIS J.E., PERCHERON F.-

Récentes acquisitions sur l'identification chromatographique des oses et des oligosaccharides.
J. Pharm. Belg. 1963, p. 23.

22 - CROOK EM., STONE B.A.-

Enzymic hydrolysis of β glucosides.
Biochem. J. 1957, 65, 1.

23 - DEICHMANN W.J. -

Déterminations of glucuronates in urine.
J. Lab. Clin. Med. 1943, 28, 770.

24 - DELSAL J.L. , MANHOURI H.-

Etude comparative des dosages colorimétriques du phosphore. IV Dosage de l'orthophosphate en présence d''esters phosphoriques.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1958, 40 , 1623.

25 - DISCHE Z.-

Uber einige neue characteristische Farbereaktionen der Thymonücleinsaüre, und eine Mikromethode zur Bestimmung derselken in tierischen Organen mit Hilfe dieser Reaktionen.
Mikrochemie, 1930, 8 , 4.

26 - DROZDOWICZ A. -

Investigations on cellulose decompostion by myxobacteria from the genus *sporocytophaga*
Acta Microbiol. Polon. 1961, 10, 255.

27 - DUNCAN W.A.M., MANNERS D.J., ROSS A.G. -

Enzyme systems in marine algae. The carbohydrase activities of unfractionated extracts of *Cladophora rupestris*, *Laminaria digitata*, *Rhodymenia palmata* *Ulva lactuca*.
Biochem. J. 1956, 63, 44.

28 - ELBEIN A.D., BARBER G.A., HASSID W.Z. -

The synthesis of cellulose by an enzyme system of higher plant.
J. Amer. Chem. Soc. 1964, 86, n° 2, 309.

29 - FAHRAEUS G. -

Studies in the cellulose decomposition by *Cytophaga*
Symbolae Botanicae Upsalienses. 1947, IX, 2.

30 - FAHRAEUS G., SIJPESTEIJN A.K. -

Adaptation of *Sporocytophaga myxococcoïdes* to sugars.
J. Gen. Microbiol. 1949, 3, n° 2, 224.

31 - FEINGOLD D.S., NEUFELD E.F., HASSID W.Z. -

Xylosyl transfer catalyzed by an *Asparagus* extract.
J. Biol. Chem. 1959, 234, 488.

32 - FESTENSTEIN G.N. -

Differenciation of cellobiase and carboxymethylcellulase by glucono-1-4 lactone.
Biochem. J. 1957, 65, 23P.

33 - FISKE C.H., SUBBAROW Y. -

The colorimetric determination of phosphorus.
J. Biol. Chem. 1925, 66, 375.

34 - FRENCH D. , WILD G.M. -

Correlation of carbohydrate structure with paper-gram mobility .
J. Amer. Chem. Soc. 1953, 75, 2612.

35 - GASCOIGNE L.A. -

Biological degradation of cellulose.
BUTTERWORTH. LONDON. 1960, p. 72.

36 - GASCOIGNE L.A., BROWN A.M. -

Biosynthesis of cellulose by *Acetobacter acetigenum*
Nature , 1960, 187, 1010.

37 - GLASER L. -

The synthesis of cellulose in cell-free extracts of *Acetobacter xylinum.*
J. Biol. Chem. 1958, 232, 627.

38 - GRACE J.B. -

The life cycle of *Sporocytophaga*
J. Gen. Microbiol. 1951, 5, 519.

39 - GRASSMANN W., ZECHMEISTER L., TOTH G., STADLER R. -

Uber den enzymatischen Abbau der Cellulose, und ihrer Spaltprodukte. 2. Mitt. Uber enzymatische Spaltung von Polysacchariden.
Liebigs Ann. 1933, 503, 167.

40 - HANES C.S., ISHERWOOD F.A. -

Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatogram.
Nature , 1949, 164, 1107.

41 - HARMSEN G.W. -

Onderzoekingen over de aërobe celluloseontleding in den grond.
Diss. WAGENINGEN 1946, pp. 1 - 229.

42 - HASH J.H. -

Cellulolytic enzymes systems of *Myrothecium verrucaria.*
Thesis, Va, Poly. Inst. BLACKSBURG, Va. 1957.

43 - HASH J.H., KING K.W. -

β glucosidases of *Myrothecium verrucaria,*
J. Biol. Chem. 1958, 232, 381.

44 - HASSID W.Z., Mc CREADY R.M. -

Identification of sugars by microscopic appearance of cristalline osazones.
Industr. Engng. Chem. 1942, 14, 8, 683.

45 - HONEYMAN J. -

Recent advances in the chemistry of cellulose and starch.
HEYWOOD and Co. LONDON. 1959.

46 - HORECKER B.L., SMYRNIOTIS P.Z.-

Reversibility of glucose-6-phosphate oxidation
Biochem. Biophys. Acta. I953, 12, 98.

47 - HULCHER F.H., KING K.W.-

Disaccharide préference of an aerobic cellulolytic bacterium *Cell-vibrio gilvus.*
J. Bacteriol. I958, 76, 565.

48 - HUNGATE R.E.-

Studies on cellulose fermentation. I The culture and physiology of an anaerobic cellulose digesting bacterium.
J. Bacteriol. I944, 48, 499.

49 - HUTCHINSON H.B., CLAYTON J.-

The decomposition of cellulose by an aerobic organism *(Spirochaetacytophaga)*
J. Agric. Sci. 1919, 9, 143.

50 - IMSENECKI A.A., SOLNTZEVA L.I.-

On aerobic cellulose decomposing bacteria.
Bull. Acad. Sci. URSS.Ser. Biol. I936, n° 6, 1115.

51 - IMSENECKI A.A., SOLNTZEVA L.I.-

Hydrolysis of cellulose by aerobic bacteria.
Microbiology, 1938, 7, 683.

52 - Van ITERSON Jr. C.-

De aantasting van cellulose door aerobe mikro-organismen.
Verslag. Akad. Wet. Wis-en Natuurkund Afd.11, 807.
Zbl. Bakteriol. II. 1904, p. 689.

53 - JAHN E.-

Beiträge zur botanischen, Protistologie.
1924, Vol. I, 16, BORNTRAGER, LEIPZIG.

54 - JEANES A., WISE C.S., DUNLER R.J.-

Improved techniques in paper chromatography of carbohydrates.
Anal. Chem. I95I, 23, 4I5.

55 - JENSEN H.L.-

Nitrogen fixation and cellulose decomposition by soil microorganism.
Proc. Linn. Soc. N.S.W., 1940, 65, 543.

56 - JERMYN M.A.-

Fungal cellulases.
IV. Production and purification of β glucosidase from *Stachybotrys atra.*
V. Enzymic properties of β-glucosidase.
Austr. J. Biol. Sci. I955, 8, 54I and 563.

57 - JERMYN M.A.-

Mechanism of carbohydrase Action.
Science I957, 125, 12.

58 - KING K.W.-

Basic properties of dextrinizing cellulases from the rumen of cattle
Va. Agr. Expt. Sta. Tech. Bull. I956, 127.

59 - KING K.W., STROVICK W.O.-

Complexity and mode of action of the cellulase system of *Cellvibrio gilvus.*
J. Biol. Chem. 1960, 225, 303.

60 - KOOIMAN P.-

Some properties of cellulase of *Myrothecium verrucaria.* and some other fungi, II.
Enzymologia, I957, 18, 371.

61 - KOSHLAND Jr. D.E.-

in BOYER P.D., LARDY H., MYRBACK K.
The Enzymes. 2nd. Edt. Academic Press, NEW YORK, 1959, vol. 1, p. 305.

62 - KRISHNA-MURTI C.R., STONE B.A.-

Fractionation of the β glucosidase from *Aspergillus niger.*
Biochem. J. I96I, 78, 7I5.

63 - KRZEMIENIEWSKA H.-

Le cycle évolutif du *Spirochaeta hutchinsoni.*
Acta. Soc. Botan. Poloniae. I930, 7, 507.

64 - LAVINTMAN N., KRISMAN C.R.-

The α glucanbranching glycosyltransferase of sweetcorn.
Biochem. Biophys. Acta 1964, 89, n° 1, 193.

65 - LELOIR L.F., CABIB E.-

The Biosynthesis of sucrose.
J. Amer. Chem. Soc. 1953, 75, 6084.

66 - LIPMANN F.-

Fermentation of phosphogluconic acid.
Nature 1936, 138, 588.

67 - LIPMANN F. TUTTLE L.C.-

A specific micromethod for the determination of acylphosphates.
J. Biol. Chem. 1945, 159, 21.

68 - LOEBECK M.E., ORDAL E.J.-

The nuclear cycle of *Myxococcus fulvus*.
J. Gen. Microbiol. 1957, 16, 76.

69 - LOICJANSKAJA M.S.-

Uber die ersten Stadien der Zellulosezersetzung, durch *Spirochaeta Cytophaga*.
Compt.Rend. Acad. Sci. URSS, 1937, 14, 381.

70 - LUKOMSKAYA I.S. -

Synthesis of oligosaccharides with 1-6 links by enzymes preparations from liver and muscle.
Dokl. Akad. Nauk. S.S.S.R. 1959, 5, 1172.

71 - Mc BEE R.H.-

The culture and physiology of a thermophilic cellulose-fermenting bacterium.
J. Bact. 1948, 56, 653.

72 - Mc BEE RH. , SIH C.J., NELSON N.M.-

Biological synthesis of cellobiose.
Science 1957, 126, 1116.

73 - Mc. ILVAINE T.C.-

A buffer solution for colorimetric comparison
J. Biol. Chem. 1921, 49, 183.

74 - MANDELS M., MILLER G.L., SLATER R.W.-

Separation of fungal carbohydrases by starch block zones electrophoresis.
Arch. Biochem. Biophys. 1961, 93, 115.

75 - MEJBAUM W. -

Uber die Bestimmung kleiner Pentosemengen insbesondere in derivaten der Adenylsaüren.
Z. Physiol. Chem. 1939, 258, 117.

76 - MEYER-PIETSCHMANN K. -

Lebendbeobachtungen an *Mycococcus rubescens*.
Arch. Mikrobiol. I95I, I6, 163.

77 - MEYER-PIETSCHMANN K. -

Beobachtungen zum nicht-lytischen und lytischen Verhalten von Myxobacterien gegenuber anderen Mikroorganismen.
Arch. Mikrobiol. 1956, 24, 297.

78 - MEYER K.H., OLISCH L. -

Position des atomes dans le nouveau modèle spatial de la cellulose.
Helv. Chim. Acta. 1937, 20, 232.

79 - MILLER G.L., BLUM R. -

Resolution of fungal cellulase by zone electrophoresis.
J. Biol. Chem. 1956, 218, 131.

80 - MILLER GL., BIRZGALLIS R. -

Carboxyméthylcellulase and cellopentase activities of electrophoretic fraction of cellulase.
Arch. Biochem. Biophys. I961, 95, 19.

81 - MILLER G.L., BIRZGALLIS R. -

Size of sample in starch. electrophoresis of cellulase.
J. Chromatogr. 1962, 7, 33.

82 - MORTON R.K. -

Methods of extraction of enzymes from animal tissues.
Methods of enzymology. Vol. I, p. 25.

83 - MOULE Y. -

Etude des acides nucléiques et de certains dérivés organiques et inorganiques du phosphore dans les tissus animaux.
Arch. Sci. Physiol. I953, 7, 161.

84 - NISIZAWA K., HASHIMOTO Y. -

Cellulose splitting enzymes.
VI. Difference in the specificities of cellulase and β glucosidase from *Irpex lacteus*.
Arch. Biochem. Biophys. I959, 81, 211.

85 - NORD F.F., VITUCCI.-

Certain aspects of the microbiological degradation of cellulose.
Advances in Enzymology. Vol. 8, p.253.

86 - NORMAN A.G., BARTHOLOMEW W.V.-

The action of some mesophilic bacteria on cellulose.
Soil. Sci. Amer. Proc. 1940, 5, 242.

87 - NORMAN A.G., FULLER W.H.-

Cellulose decomposition
Advances in Enzymology, Vol. 2, p. 239.

88 - OERTEL G.W.-

Chromatography of uronic acids, sugars acid lactones, and glucuronosides on anion exchange paper or DEAE cellulose.
J. Chromatogr. 1962, 8, 486.

89 - OMELIANSKY W.-

Uber die Gärung der Zellulose.
Zbl. Bakteriol. II, 1902, 8, 225.

90 - PEAT S., WHELAN W.J., ROBERTS J.G.-

The structure of lichenin
J. Chem. Soc. I957, p. 3916.

91 - PERLIN A.S.-

Action of β glycanases on β glycans.
In Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials.
PERGAMON PRESS. NEW YORK CITY. NEW YORK 1963.

92 - PETTERSON G., COWLING E.B., PORATH J.-

Studies on cellulolytic enzymes.
I. Isolation of cellulase of *Polyporus versicolor*.
II. Multiplicity of the cellulolytic enzymes of *Polyporus versicolor*.
Biochem. Biophys. Acta. I963, 67, 1 and 9.

93 - PIGMANN W.W.-

Action of the glycosidases.
Advances in Enzymology. 1944, Vol. 4, p. 41.

94 - POCHON J. -

Rôle d'une bactérie cellulolytique de la panse : *Plectridium cellulolyticum*, dans la digestion de la cellulose chez les ruminants.
Ann. Inst. Pasteur. 1935, 55, 676.

95 - POCHON J. -

Fermentation de la cellulose par *Terminosporus thermocellulolyticus* Ann. Inst. Pasteur. 1942, 68, 353.

96 - POPOFF L. -

Uber die Sumpfgasgärung.
Arch. Ges. Physiol. 1875, 10, 113.

97 - PRINGSHEIM H.

Uber die fermentativen Abbau der cellulose.
Z. Physiol. Chem. 1912, 78, 266.

98 - REESE E.T., SIU R.G.H., LEVINSON H.S. -

Biological degradation of soluble cellulose derivatives.
J. Bact. 1950, 59, 485.

99 - REESE E.T., LEVINSON H.S., MANDELS G.R. -

Products of enzymatic hydrolysis of cellulose and its derivatives.
Arch. Biochem. Biophys. 1951, 31, 351.

100 - REESE E.T., GILLIGAN W. -

Swelling factor in cellulose hydrolysis.
Text. Res. J. 1954, 24, 663.

101 - REESE E.T. -

A microbiological process report : enzymatic hydrolysis of cellulose.
Appl. Microbiol. 1956, 4, 39.

102 - REESE ET., TRIPP V., SEGAL L. -

Effect of cellulases on celluloses and hydrocelluloses
Text. Res. J. 1957, 27, 626.

103 - REESE E.T. -

Cellulose decomposition : Fungi.
Reprinted from Marine Boring and Fouling Organisms.
Edited by DIXY LEE RAY ; FRIDAY HARBOR SYMPOSIA.
University of WASHINGTON Press, Seattle, 1959.

104 - REESE E.T., MANDELS M.-

β D, 1-3 glucanases in fungi.
Canad. J. Microbiol. 1959, 5, 173.

105 - REESE E.T., MANDELS M.-

A new α glucanase ; mycodextranase.
Canad. J. Microbiol. 1964, 10, 103.

106 - RIVIERE J.-

Activité cellulolytique des bactéries aérobies du sol.
I. Isolement et purification .
Ann. Agron. 1961, 12, (4), 385.

107 - ROBINSON D., SMITH J.N., WILLIAMS R.T.-

Studies in detoxication.
The metabolism of alkylbenzenes, isopropyl benzène (cumene) and derivatives of hydratropic acid.
Biochem. J. 1955, 59, 153.

108 - ROLLINS M.L., TRIPP V. W.

Light microscopy of cellulose and cellulose derivatives.
Electron microscopy of cellulose and cellulose derivatives.
in Methods in Carbohydrate Chemistry . III (Cellulose)
Acad. Press. NEW YORK 1963, p. 335.

109 - SCHNEIDER W.C.-

Phosphorus compounds in animal tissues.
I. Extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid, and pentose nucleic acid.
J. Biol. Chem. 1945, 161, 293.

110 - SCHWIMMER S., BEVENUE A.-

Reagent for differentiation of 1-4 and 1-6 linked glucosaccharides.
Science 1956, 123, 543.

111 - SELBY K.-

The degradation of cotton cellulose by the extracellular enzyme of ***Myrothecium verrucaria***.
Biochem. J. 1961, 79 , 562.

112 - SELBY K., MAITLAND C.C., THOMPSON K.V.A.-

The degradation of cotton cellulose by extracellular cellulase of *Myrothecium verrucaria*
II. The existence of an exhaustible cellulase.
Biochem. J. 1963, 88, 288.

113 - SIMOLA P.E.-

Uber den Abbau der Cellulose durch Mikro-organismen. I.
Ann. Acad. Sci. Fenn. Ser. A 34, 1931, n° 1, p. 1.

114 - SIMOLA P.E.-

Uber den Abbau der Cellulose durch Mikro-organismen. II.
Ann. Acad. Sci. Fenn. Ser. A 34, 1931, n° 6, p. 1.

115 - SISON B.C., SCHUBERT W.J., NORD F.F.-

On the mechanism of enzyme action.
A cellulolytic enzyme from the mold *Poria vaillantii*.
Arch. Biochem. Biophys. 1958, 75, 260.

116 - STADTMAN E.R., BARKER H.A.-

Fatty acid synthesis by enzyme preparations of *Clostridium Kluyveri*.
J. Biol. Chem. 1950, 184, 769.

117 - STAPP C., BORTELS H.-

Mikrobiologische Untersuchungen über die Zersetzung von Waldstreu.
Zbl. Bakteriol. II, 1934, 90, 28.

118 - STANIER R.Y.-

The *Cytophaga* group. A contribution to the biology of Myxobacteria.
Bact. Rev. 1942, 6, 143.

119 - STANIER R.Y.-

La place des bactéries dans le monde vivant.
Ann. Inst. PASTEUR, 1961, 101, p. 297.

120 - STAUDINGER H.-

Makromolekulare Chemie und Biologie
Basel : Wepf 1947.

121 - STONE B.A.-

Biochemistry of cellulose and related Polysaccharides.
Nature. 1958, 182, 687.

122 - SUMNER J.B., SOMERS G.F.-

Laboratory Experiments in biological chemistry.
Acad. Press. New-York City. NEW YORK 1944.

123 - THOMAS R.-

Fungal cellulases.
VII. *Stachybotrys atra.* Production and Properties of the cellulolytic enzyme.
Austral. J. Biol. Sci. 1956, 9, 159.

124 - TO-DONG -

Contribution à l'étude des α galactosidases des Plantaginacées.
Thèse doctorat d'Etat, Pharmacie, Paris, 1961.

125 - WAKSMAN S.A., CAREY C.-

The use of silica-gel plate for demonstrating the occurence and abundance of cellulose decomposing bacteria.
J. Bact. 1926, 12, 87.

126 - WALKER E., WARREN F.L.-

Decomposition of cellulose by *Cytophaga.*
Biochem. J. 1938, 32, 31.

127 - WALSETH C.S.-

Influence of fine structure of cellulose on the action of cellulases.
Tappi. 1952, 35, 233.

128 - WEIGL J.-

Uber dem Stoffwechsel und die cellulosesynthèse von *Acetobacter xylinum-brown* Holland.
Arch. Mikrobiol. 1961, 38, 350.

129 - WEIGL J.

Zum Mechanismus des enzymatischen Celluloseabbaus durch *Merulius lacrymans.*
Archiv. Mikrobiol., 1961, 38, 411.

130 - WHITAKER D.R.-

Purification of *Myrothecium verrucaria* cellulase.
Arch. Biochem. Biophys. 1953, 43, 253.

131 - WHITAKER D.R. -

Hydrolysis of oligoglucosides β 1-4 by *Myrothecium verrucaria* Cellulase.
Arch. Biochem. Biophys. 1954, 53, 439.

132 - WHITAKER D.R. -

The mechanism of degradation of cellulose by *Myrothecium verruca* cellulase.
Canad.J. Biochem. Physiol. 1957, 35, 733.

133 - WHITAKER D.R.

Improved procedures for preparation and characterization of *Myrothecium* cellulase
Canad. J. Biochem. Physiol. 1963, 41, p. 667-718.

134 - WINOGRADSKY S. -

Etudes sur la microbiologie du sol. Sur la dégradation de la cellulose dans le sol.
Ann. Inst. PASTEUR, 1929, 43, 549.

135 - WINOGRADSKY S. -

Sur la décomposition aérobie de la cellulose par les Bactéries Travaux récents.
Bull. Inst. PASTEUR , 1932, 30, 369.

136 - YOUATT G. -

Fungal cellulases.
IX. Croissance du *Stachybotrys atra* sur la cellulose et formation de glucosidase hydrolysant le cellobiose.
Austr. J. Biol. Science. 1958, 11, 209.

oOo

ACEMP